

**Entwicklung und Charakterisierung eines  
halbfesten Systems zur  
Verbesserung der Permeation von  
5-Aminolävulinsäure durch  
exzidiertes humanes Stratum corneum**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
Dissertation

von Nadja Grüning  
aus Osnabrück

1.Referentin:	Professor Dr. Christel Müller-Goymann
2. Referent:	Professor Dr. Joachim Klein
eingereicht am:	23.07.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	02.10.2007
Druckjahr	2007

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Grüning, N., Müller-Goymann, C.C.: Physicochemical characterisation of a novel thermogelling formulation for percutaneous penetration of 5-aminolevulinic acid. J Pharm Sci (in press).

## **Tagungsbeiträge**

Grüning, N., Müller-Goymann, C.C.: Perkutane Penetration von 5-Aminolävulinsäure durch humanes Stratum corneum aus Arzneibuchgrundlagen und einem kubisch flüssigkristallinen System (Thermogel). (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (2005).

Grüning, N., Müller-Goymann, C.C.: Differential scanning calorimetry of human stratum corneum treated with a semisolid system named Thermogel, its components and combinations there of. (Poster) 5<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf/Schweiz (2006).

## **Patentanmeldung**

Grüning, N., Müller-Goymann, C.C., Technische Universität Braunschweig: Formulierung zur dermalen Anwendung. Europäische Patentanmeldung EP 06 113 022.5 (2006).

**Für meine lieben Eltern**

Man sieht nur mit dem Herzen gut,  
das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar.

(aus: „Der kleine Prinz“  
von Antoine de Saint-Exupéry)

---

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich ganz herzlich für die Zuweisung des interessanten Themas und die erwiesene Unterstützung bei dessen Bearbeitung. Die ständige Diskussionsbereitschaft und die jederzeit nette persönliche Betreuung werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. Joachim Klein danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Technologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und hilfreiche Unterstützung bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Ich danke auch besonders herzlich einigen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazeutische Chemie für die anregenden institutsübergreifenden Diskussionen, die mir eine relativierende Sichtweise auf viele Dinge ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Carmen Gröchte-meier, die mich vor allem bei rheologischen Messungen intensiv unterstützt hat, sowie Antje Bieder, die die Dichtebestimmungen für mich durchgeführt hat. Frau Juliane Schildt danke ich für die DSC-Messungen und Frau Jahn für die Durchführung der röntgenologischen Untersuchungen.

Bei Dr. Flory des Holwede-Krankenhauses, D-Braunschweig, bedanke ich mich für die Überlassung der Hautproben. Weiterhin bedanke ich mich bei der Medac GmbH, D-Wedel, für die großzügige Bereitstellung von 5-Aminolävulinsäure.

Von Herzen danke ich meinen lieben Eltern, die mich vor allem während des Studiums und der Promotion unterstützt und mir damit eine hervorragende Ausbildung ermöglicht haben. Meinem Bruder Kaj danke ich für die aufmunternden und motivierenden Gespräche während der Promotionszeit und dafür, dass er immer für mich da ist, auch wenn er weit weg ist.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>5-Aminolävulinsäure (5-ALA)</b>	<b>3</b>
2.1.1	Physiologisches Vorkommen von 5-ALA und ihre Bedeutung	3
2.1.2	Störungen in der Porphyrinsynthese	4
<b>2.2</b>	<b>Photodynamische Therapie (PDT)</b>	<b>5</b>
2.2.1	Wirkmechanismus	6
2.2.2	Photodynamische Diagnose	8
2.2.3	Selektive Bildung von PpIX in Tumorzellen	8
2.2.4	Eingesetzte Photosensibilisatoren und der Mechanismus ihrer Aufnahme ins Gewebe	9
2.2.5	Fertigarzneimittel für die PDT	10
2.2.6	Natürliche Photosensibilisatoren	11
<b>2.3</b>	<b>Einsatz von 5-ALA</b>	<b>12</b>
2.3.1	Topische PDT mit ALA	13
2.3.2	Probleme bei Formulierungen mit 5-ALA	14
2.3.3	Steigerung der Bioverfügbarkeit von 5-ALA nach topischer Applikation	16
2.3.3.1	Veresterung	16
2.3.3.2	Zusatz permeationsfördernder Substanzen zur Formulierung	18
2.3.3.3	Einsatz physikalischer Methoden	18
2.3.3.4	Optimierung der Formulierung	19
<b>2.4</b>	<b>Potentielle Einsatzgebiete der PDT im Entwicklungsstadium</b>	<b>20</b>
<b>2.5</b>	<b>Haut</b>	<b>24</b>
2.5.1	Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	24
2.5.2	Aufbau der Epidermis	25
2.5.3	Aufbau des Stratum corneum	26
2.5.4	Mikrostruktur des Stratum corneum	27
2.5.5	Arzneistoffpermeation durch das Stratum corneum	29
2.5.6	Permeationsförderung durch das Stratum corneum	30
2.5.7	Quantifizierung der Arzneistoffpermeation durch Stratum corneum	32

---

<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
3.2.1	Manuelle Herstellung der Rezepturen	36
3.2.1.1	Basiscreme DAC	36
3.2.1.2	Wasserhaltige Hydrophile Salbe	36
3.2.1.3	Entwicklung der Rezeptur des Thermogels	36
3.2.2	Einarbeitung von 5-ALA in die Grundlagen	37
3.2.3	Rheologische Untersuchungen	37
3.2.4	Isolierung, Präparation und Aufbewahrung des exzidierten humanen Stratum corneum	39
3.2.5	Permeationsuntersuchungen	39
3.2.6	Dichte-Bestimmung	40
3.2.7	pH-Messung	40
3.2.8	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	41
3.2.9	Derivatisierung von 5-ALA zur fluorimetrischen Detektion	41
3.2.10	Thermoanalyse	42
3.2.10.1	Thermogravimetrie (TG)	42
3.2.10.2	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	43
3.2.11	Polarisationsmikroskopie	43
3.2.12	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	44
3.2.13	Neutralrot-Test	44
3.2.14	UV/VIS-Spektroskopie	45
3.2.15	Röntgenografische Methoden	45
3.2.15.1	Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)	45
3.2.15.2	Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD)	46
<b>4</b>	<b>Versuchsergebnisse und Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklung der Thermogel-Komposition</b>	<b>47</b>
4.1.1	Vorlagen für die Entwicklung der optimierten halbfesten Formulierung	47
4.1.2	Zusammensetzung des Thermogels	48
<b>4.2</b>	<b>Rheologie</b>	<b>49</b>
4.2.1	Viskosimetrische Bestimmung der Fließgrenzen	50



---

4.2.2	Charakterisierung des Fließverhaltens eingesetzter Modellgrundlagen	54
4.2.3	Oszillationsrheologische Charakterisierung des Thermogels	56
4.2.3.1	Bestimmung des viskoelastischen Bereichs	57
4.2.3.2	Bestimmung des Gel-Punktes von Thermogel	58
4.2.3.3	Charakterisierung des Fließverhaltens von Thermogel	61
4.2.4	Einfluss von Salzen auf das Fließverhalten von Thermogel	65
4.2.4.1	5-ALA	65
4.2.4.2	Kochsalz (NaCl)	67
4.2.4.3	p-Aminobenzoësäure	69
4.2.4.4	Zusammenfassung des Salzeinflusses auf das Fließverhalten von Thermogel	72
4.2.5	Einfluss der 5-ALA-Konzentration auf Gelierung von Thermogel	72
4.2.6	Einfluss des pH-Wertes auf die Fließeigenschaften von Thermogel	74
<b>4.3</b>	<b>Permeation von 5-ALA aus Modellgrundlagen</b>	<b>75</b>
<b>4.4</b>	<b>Thermoanalytische Untersuchungen an exzidiertem humanen Stratum corneum</b>	<b>83</b>
4.4.1	DSC-Messungen	83
4.4.2	Thermogravimetrie	88
<b>4.5</b>	<b>Thermogel-Variationen</b>	<b>88</b>
4.5.1	Zusammensetzung	88
4.5.2	Bestimmung des Gel-Punktes der Thermogel-Variationen	89
4.5.3	Permeation von 5-ALA aus Thermogel und Thermogel-Variationen	94
4.5.4	DSC-Messungen	101
4.5.5	Penetrationsenhancer des Thermogels	106
<b>4.6</b>	<b>Röntgenweitwinkelmessungen</b>	<b>108</b>
4.6.1	an exzidiertem humanen Stratum corneum	108
4.6.2	an Probiol®	111
4.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Röntgenuntersuchungen	115
<b>4.7</b>	<b>Röntgenkleinwinkelmessungen</b>	<b>116</b>
<b>4.8</b>	<b>TEM-Untersuchungen</b>	<b>116</b>
<b>4.9</b>	<b>Neutralrot-Test</b>	<b>116</b>

---

<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion</b>	<b>119</b>
5.1	Entwicklung und Charakterisierung des flüssigkristallinen Systems Thermogel	119
5.2	Rheologische Untersuchungen an Thermogel und Variationen	121
5.3	<i>In vitro</i> -Permeationsstudien	124
5.4	Einfluss der Vehikel auf die Mikrostruktur des Stratum corneum	128
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>

## 1 Einleitung und Problemstellung

5-Aminolävulinsäure (5-ALA) ist eine im menschlichen Körper vorkommende Aminosäure, die als Ausgangssubstanz des Porphyrinstoffwechsels fungiert. In der photodynamischen Therapie wird sie topisch zur Behandlung aktinischer Keratosen eingesetzt, da sie sich selektiv in den entarteten Zellen anreichert und zur Bildung einer photosensibilisierenden Substanz (Protoporphyrin IX = PpIX) beiträgt. PpIX wird durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge in Gegenwart von Sauerstoff aktiviert und zerstört das tumorartig veränderte Hautgewebe.

Da es sich bei 5-ALA um eine Aminosäure mit polarem Charakter handelt, penetriert diese dementsprechend schlecht durch die lipophile Hornhautbarriere, das Stratum corneum (SC) der menschlichen Haut. Um sie an den zur Therapie gewünschten Ort, in tiefere Schichten der Epidermis zu befördern, gibt es zwei Ansätze: Einerseits kann sie in ein halbfestes Vehikel mit permeationsfördernden Zusätzen verpackt werden, andererseits kann ihre Struktur selbst verändert werden, um sie lipophiler und damit Stratum corneum gängiger zu gestalten. Ein etabliertes Fertigarzneimittel zur dermalen Anwendung namens Metvix® hat diesen Ansatz aufgegriffen und realisiert; es beinhaltet den Methylester der 5-ALA und erreicht durch diese Lipophilisierung eine verbesserte Permeation im Vergleich zur freien Säure.

Da eine Veresterung aber mit größerem Zeit-, Arbeits- und finanziellem Aufwand einhergeht, soll im Rahmen dieser Arbeit eine halbfeste Zubereitung zur dermalen Anwendung generiert werden, in die die unveresterte 5-ALA eingearbeitet wird. In Anlehnung an die Komposition des ibuprofenhaltigen Fertigarzneimittels Dolgit® Mikrogel, das Poloxamer als Polymer enthält und sich als permeationsförderndes Vehikel für den 5-ALA-Butylester bewährt hat [Winkler, 2005], soll eine ibuprofenfreie Grundlage zur Aufnahme von 5-ALA entwickelt werden, die ggf. mit permeationsfördernden Stoffen im Vergleich zu Standardrezepturen des Deutschen Arzneibuches eine verbesserte Arzneistoffpenetration und -permeation erlaubt. Die permeationsfördernden Hilfsstoffe könnten dabei assistieren, dass das menschliche Stratum corneum vorübergehend in seiner Struktur verändert und dadurch durchlässiger für den

Arzneistoff wird. Der Vorteil wäre, dass die Aminosäure diese Barriere in ausreichenden Mengen passieren könnte und somit besser bioverfügbar wäre.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit sind daher folgende:

- Formulierung einer halbfesten Grundlage auf Basis von Poloxamer 407 zur Steigerung der dermalen Verfügbarkeit von 5-ALA
- Physikochemische Charakterisierung dieser Grundlage
- Permeation von 5-ALA durch exzidiertes humanes Stratum corneum aus der optimierten halbfesten Zubereitung
- Physikochemische Charakterisierung von Variationen der Grundlage. Untersuchung von Kombinationen der Komponenten der formulierten Grundlage in Hinsicht auf synergistische Effekte der Permeationsförderung
- Permeation von 5-ALA aus Variationen des formulierten halbfesten Systems

## **2 Allgemeiner Teil**

### **2.1 5-Aminolävulinsäure (5-ALA)**

#### **2.1.1 Physiologisches Vorkommen von 5-ALA und ihre Bedeutung**

5-ALA ist die erste wichtige Vorstufe der endogenen Porphyrine. Die Biosynthese dieser Stoffgruppe ist eine wichtige Reaktion, die ubiquitär in allen Zellen stattfindet, um diese mit Cytochromen und anderen Hämgrundgerüsten zu versorgen. Den ersten Schritt bei der Porphyrinsynthese von Säugern stellt die Kondensation von Succinyl-CoA mit Glycin zu 5-Aminolävulinat dar. Diese Reaktion wird enzymatisch durch die 5-Aminolävulinat-Synthase in den Mitochondrien katalysiert. 5-ALA verlässt nun das Mitochondrium und kondensiert im Zytoplasma mit einem weiteren 5-ALA-Molekül zu Porphobilinogen, was ebenfalls enzymatisch unterstützt wird. Vier solcher Moleküle reagieren dann zu einem linearen Tetrapyrrol, das wiederum unter Ammoniumverlust und Mitwirkung einer Synthase und Cosynthase zum Uroporphyrinogen III zyklisiert. Es schließt sich nun die eigentliche Bildung des Porphyringrundkörpers an.

Eine Kaskade von Reaktionen verändert die Seitenketten sowie den Sättigungsgrad des Porphyrinringes. Aus Uroporphyrinogen III entsteht durch Decarboxylierung der Acetatseitenketten zunächst Coproporphyrinogen III. Im nachfolgenden Schritt entsteht der in der Photodynamischen Therapie von zentraler Wichtigkeit auftretende Photosensibilisator Protoporphyrin IX (PpIX). Dies geschieht durch Einführung von Doppelbindungen in den Porphyrinring und Umwandlung zweier Propionatseitenketten in Vinylgruppen des Coproporphyrinogen III und findet wiederum im Mitochondrium statt.

Durch Chelatbildung mit Eisen unter Einfluss des Enzyms Ferrochelatase entsteht schließlich das Häm, die prosthetische Gruppe von Proteinen wie Myoglobin, Hämoglobin, Katalase, Peroxidase und Cytochrom c. Die Steuerung dieses Biosyntheseweges erfolgt mittels Feedback-Hemmung durch das entstehende Häm. So wird auch die Schrittmacher-Reaktion dieses Stoffwechselweges, die Bildung der 5-ALA gesteuert: Häm hemmt die 5-ALA-Synthase und unterdrückt außerdem ihre Bildung [Stryer, 1990]. Der Prozess der Häm-Bildung regelt sich

also unter physiologischen Bedingungen in der Zelle von selbst: Je mehr Häm gebildet worden ist, desto stärker wird die 5-ALA-Synthase gehemmt und die Häm-Produktion kommt schließlich zum Erliegen. Wird wiederum Häm gebraucht, lässt die Inhibierung des Enzyms nach und die Produktion wird wieder aufgenommen. In der Photodynamischen Therapie wird eben dieser geschwindigkeitsbestimmende Syntheseschritt umgangen, wodurch es zur Akkumulation an PpIX in den Zellen kommt.

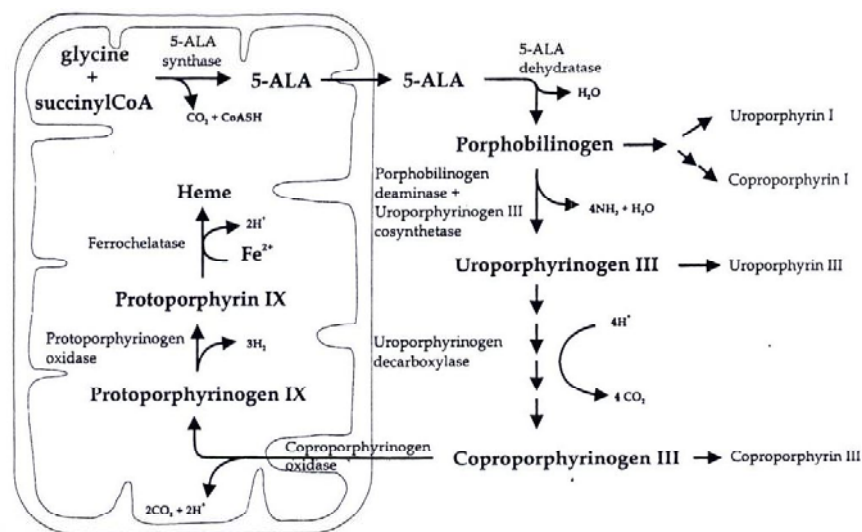


Abb. 2.1: Häm-Biosynthese, Porphyrinstoffwechsel [Peng et al., 1997a]

### 2.1.2 Störungen in der Porphyrinsynthese

Die im Zuge der oben vorgestellten Synthesekette entstehenden Substanzen, zu denen auch das PpIX gehört, sind sehr starke Photosensibilisatoren. Wenn der komplexe Porphyrin-Stoffwechsel gestört ist, kommt es zu sogenannten Porphyrien. Diese können sowohl durch toxische Substanzen oder gewisse Arzneimittel hervorgerufen werden, als auch hereditär bedingt sein. Dann handelt es sich um erbliche Stoffwechselkrankheiten, bei denen es zu einer erhöhten Produktion und Ausscheidung an Porphyrin- und Häm-Vorstufen kommt. Die Ursache liegt in der Verminderung der Aktivität bestimmter Enzyme.

Man unterscheidet erythropoetische Porphyrien, die als Folge eines Mangels an Uroporphyrinogen-III-Cosynthase entstehen. Dieses Enzym bewirkt normalerweise die Bildung des asymmetrischen Isomers Uroporphyrinogen III nach der Zyklisierung des linearen Tetrapyrrols. Ist es nicht ausreichend vorhanden, werden große Mengen des symmetrischen Isomers gebildet, das keine physiologische Stoffwechselfunktion besitzt und sich somit anreichert. Die Erythrozyten werden bei dieser Krankheit vorzeitig abgebaut, daher ist der Harn der betroffenen Personen rot gefärbt, und die Zähne zeigen unter UV-Licht eine starke Rotfluoreszenz. Ferner ist die Haut meist sehr lichtempfindlich. Die Einlagerung von Uroporphyrinogen und Coproporphyrinogen in die Haut sensibilisiert diese gegen Licht, so dass es an Hautpartien, die dem Licht ausgesetzt sind, zu schweren Photodermatosen kommen kann [Karlson et al., 1994].

Ferner existiert die akute intermittierende Porphyrie, die zu den hepatischen Porphyrien gehört. Im Gegensatz zur erythropoetischen Porphyrie sind nicht die Erythrozyten, sondern die Leber befallen, wobei die Haut typischerweise nicht lichtempfindlich ist. Die Aktivität der Uroporphyrinogen-Synthase ist stark herabgesetzt, im gleichen Zuge besteht allerdings eine kompensatorische Steigerung der 5-ALA-Synthase. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation an 5-ALA und Porphobilinogen in der Leber, und große Mengen dieser Substanzen werden mit dem Harn ausgeschieden. Es kommt zu abdominalen Schmerzen und neurologischen Störungen. Wie der Name schon erkennen lässt, tritt diese Krankheit mit ihren Symptomen episodisch auf.

## **2.2 Photodynamische Therapie (PDT)**

Die Photodynamische Therapie macht sich die Eigenschaft der Porphyrine zunutze, nach Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge in Gegenwart von Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies bilden zu können. Diese oxidieren verschiedene Biomoleküle einer Zelle, was bei entsprechender Intensität zu ihrem Absterben führt. Da sich die Porphyrine vorwiegend in Tumorzellen anreichern, ist eine Therapie auf diesem Wege möglich.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannte der Münchner Pharmakologe Hermann von Tappeiner die Phototoxizität gewisser Farbstoffe. Er studierte dieses

Phänomen und beschrieb es als sauerstoffabhängige Zerstörung von lebenden Zellen nach Photosensibilisierung mit Licht. Er war der Pionier der Photodynamischen Therapie und prägte diesen Begriff, da er als Erster begann, Hauttumore auf diese Weise zu behandeln: Einer 70jährigen Patientin mit schuppigem Hautkarzinom im Gesicht trug er wiederholt während zwei Stunden auf den betroffenen Partien topisch eine 5 %ige Eosin-Farblösung auf und setzte sie für diesen Zeitraum dem Sonnenlicht aus. Der Tumor verschwand vollständig durch diese Behandlung [Szeimies et al., 1996]. Heute ist der Einsatz von Farbstoffen wie Eosin und Acridin aufgrund ihrer Toxizität und Kanzerogenität obsolet. Schon ab 1913 wurden Porphyrine wie Hämatoporphyrin für die PDT entdeckt [Szeimies et al., 1996].

### **2.2.1 Wirkmechanismus**

Wie unter 2.1.1 dargestellt, ist das photosensibilisierende PpIX die Schlüsselsubstanz der PDT. Es ist ferner bekannt, dass zur Auslösung eines photodynamischen Effekts drei Agenzien zur gleichen Zeit am gleichen Ort vorhanden sein müssen:

- 1) Ein Photosensibilisator
- 2) Sauerstoff
- 3) Energie in Form von Licht geeigneter Wellenlänge.

Sind alle diese Voraussetzungen erfüllt, kommt es zu folgenden Reaktionen: Zunächst einmal wird der Photosensibilisator mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt. Die geeignete Wellenlänge richtet sich nach dem Absorptionsspektrum der Porphyrine. Soll ein Molekül mit Licht angeregt werden, wird normalerweise die Wellenlänge seines Absorptionsmaximums ausgewählt, da dort generell die Empfindlichkeit am höchsten und somit die Absorption am stärksten ist. Folglich wäre die zu erwartende photodynamische Reaktion im Absorptionsmaximum der Porphyrine bei 405 nm am stärksten. Tatsächlich wählt man aber die Anregungswellenlänge von ca. 630 nm, die im roten Teil des sichtbaren Spektrums liegt. Dies ist von Vorteil, da längerwelliges Licht weiter in die Haut eindringen und somit auch tiefer liegende Tumore erfassen kann.



Im Grundzustand befindet sich der Photosensibilisator wie fast alle Moleküle im Singulettzustand. Das bedeutet, dass die Elektronen mit antiparallelem Spin vorliegen. Absorbiert der Photosensibilisator Licht, wird er von seinem Grundzustand in einen energiereichen angeregten Singulettzustand überführt und aktiviert. Von dort kann er entweder zurück in den Grundzustand fallen oder in einem weiteren Reaktionsschritt durch das sogenannte „intersystem crossing“ in einen angeregten Triplett-Zustand mit parallelem Spin der Valenzelektronen überführt werden [Oleinick und Evans, 1998].

Für dieses angeregte Triplett sind nun zwei Arten von Reaktionen möglich: Einerseits kann es in einer Redox-Reaktion mit einem Substrat aus seiner unmittelbaren Umgebung wie z.B. einem Membranlipid reagieren. Dabei kommt es zum Elektronentransfer und die Lipide liegen radikalisch vor. Diese reagieren mit Sauerstoff weiter, wobei es zur Bildung von Peroxy-Radikalen kommt  $O_2^-$  (Typ-I-Photo-Reaktion).

Eine weitere mögliche Reaktion für den im Triplett-Zustand befindlichen Photosensitizer ist der Energietransfer auf benachbarte Sauerstoff-Moleküle im Triplett-Grundzustand, wodurch es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) kommt (Typ-II-Photo-Reaktion). Diese hochreaktive und aggressive Form des Sauerstoffs wird mit anderen Sauerstoffradikalen unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefasst [Foote, 1968, Henderson und Dougherty, 1991].

Sie zerstören oxidativ zelluläre Strukturen wie Mitochondrien und Lysosomen, sowie jegliche Art von Biomembranen. Mit dem Verlust der Zellintegrität geht die Freisetzung diverser Entzündungs- und Abwehr-Mediatoren einher. Eine breite Palette von Eicosanoiden wird genauso ausgeschüttet wie Histamin. Die unmittelbaren makroskopischen Reaktionen auf die PDT sind folglich Gefäßveränderungen wie Ödem- und Erythembildung. Letzten Endes gehen die betroffenen Zellen durch die Kombination von Schädigungen auf zellulärer Ebene und der Aktivierung von Zelltod auslösenden Reaktionskaskaden apoptotisch zugrunde [Oleinick, 1998].

### **2.2.2 Photodynamische Diagnose**

Die unter 2.2.1 beschriebenen Moleküle im Singulettzustand müssen die aufgenommene, überschüssige Energie gemäß des Energieerhaltungssatzes wieder abgeben. Dies geschieht unter Aussendung von längerwelligem Fluoreszenzlicht. Dieses Phänomen kann folglich zur präzisen Abgrenzung und Diagnostik von entzündlich bzw. tumorartig verändertem Gewebe gegenüber gesunder Haut genutzt werden [Fritsch et al., 1996a]. Dazu wird nach 5-ALA-Gabe ein erkranktes Hautareal mit dem sogenannten Wood-Licht (Licht der Wellenlänge des Absorptionsmaximums der Porphyrine von 405 nm) bestrahlt, und das Molekül reagiert dann mit Aussendung einer charakteristischen roten Fluoreszenz [Fritsch et al., 1997].

### **2.2.3 Selektive Bildung von PpIX in Tumorzellen**

Die Selektivität, mit der die 5-ALA-Anreicherung und damit die PpIX-Akkumulation bevorzugt in kranken Zellen stattfindet, ist auf eine veränderte Aktivität bestimmter Enzyme im Tumor zurückzuführen [Peng et al., 1997a]. Einerseits sind die Aktivitäten der ALA-Dehydrogenase und der Porphobilinogen-Deaminase gesteigert. Beide Enzyme sind im Zytoplasma aktiv, wobei das erstgenannte 5-ALA zu Porphobilinogen umsetzt, und das zweitgenannte dieses anschließend zu Uroporphyrinogen III umwandelt, wodurch schneller PpIX gebildet wird.

Andererseits ist sowohl die Aktivität der Ferrochelatase als auch der ALA-Synthase vermindert. Im ersten Fall wird dadurch der Einbau von Eisen in den Tetrapyrrolring des PpIX verlangsamt, was die Akkumulation im Mitochondrium fördert. Die verringerte Arbeitskraft der ALA-Synthase ist kein limitierender Faktor für die Bildung des PpIX, da der von ihr katalysierte Reaktionsschritt durch die exogene ALA-Gabe umgangen wird. Ferner besteht bei tumorösem Gewebe eine erhöhte Permeabilität.

### **2.2.4 Eingesetzte Photosensibilisatoren und der Mechanismus ihrer Aufnahme ins Gewebe**

Bis im Jahre 1990 die lokale tumorselektive Photosensibilisierung durch die Applikation der Porphyrin-Vorstufe 5-ALA entscheidend verbessert wurde, setzte man in den 1970er Jahren sogenannte Photosensibilisatoren der ersten Generation ein. Dabei handelte es sich um Hämatoporphyrin-Derivate (HpD), die später aufgereinigt unter dem Handelsnamen Photofrin® auf den Arzneimittelmarkt kamen und intravenös verabreicht zur Behandlung von nicht kleinzelligen endobronchialen Frühkarzinomen zugelassen sind [Rote Liste, 2006]. Es handelt sich dabei um ein komplexes Gemisch von Porphyrin-Mono- und -Oligomeren mit der Bezeichnung Porfimer-Natrium [Henderson und Dougherty, 1991, Dougherty, 1987]. Die Verbindungen, die in das Gewebe aufgenommen werden, sind die sogenannten DHE (Dihämatoporphyrin-Ester). Sie bestehen aus Ether und Ester gebundenen Porphyrin-Einheiten, die dimer bis oligomer kovalent verbunden sind. DHE vereint die Tumor lokalisierende und photosensibilisierende Aktivität [Dougherty, 1987]. Es ist heute allgemein anerkannt, dass die Tumorselektivität mit dem lipophilen Charakter des photosensibilisierenden Agens ansteigt und Photofrin vorzugsweise in neoplastischem Gewebe akkumuliert [Chwilkowska et al., 2003].

Die vermehrte Aufnahme der Porphyrin-Derivate durch Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen kann folgendermaßen erklärt werden: Da proliferierende Zellen bekanntermaßen eine erhöhte LDL (low density lipoprotein) Rezeptor-Aktivität aufweisen, um Cholesterol für die Membransynthese zu generieren, assistieren sie möglicherweise bei der Aufnahme der photosensibilisierend wirkenden Stoffe [Dougherty, 1987]. Polo et al. [2002] untersuchten eingehend die Rolle der LDL-Rezeptoren in der Anhäufung von LDL-Photosensibilisator-Komplexen in menschlichen Fibrosarkom-Zellen. Sie stellten fest, dass LDL als Carrier für Hämatoporphyrin und Zn(II)-Phthalocyanin fungieren und damit deren Akkumulation in proliferierenden Zellen unterstützen. Hinzu kommt, dass Tumorgewebe typischerweise über eine schwache Lymphdrainage verfügt, was die verlängerte Retention in diesem Gewebe erklärt [Jori, 1990]. Der Nachteil dieser Substanzen liegt allerdings darin, dass sie bei systemischer Gabe nicht auf das zu therapierende Tumoreal beschränkt bleiben und darüber hinaus eine

über 6-8 Wochen bestehendbleibende, generalisierte, kutane Photosensitivität resultiert. Ferner konnte mit der Bestrahlung aufgrund der Kinetik des Photosensibilisators erst nach 24-96 h nach intravenöser Gabe begonnen werden. Die Entwicklung der Photosensibilisatoren der zweiten Generation hat, neben der Aktivierung durch längerwelliges und damit tiefer ins Gewebe dringendes Licht, die Zielsetzung, die posttherapeutische Phase der Lichtempfindlichkeit zu minimieren. Durch eine schnellere Kinetik können die Gabe des Photosensibilisators und die Bestrahlung zum gleichen Zeitpunkt geschehen, und die verstärkte Lichtempfindlichkeit besteht nunmehr weniger als eine Woche [Boehncke und Kaufmann, 1996].

Im Laufe der Jahre wurden die sogenannten Photosensibilisatoren der zweiten Generation mit chemisch definierter Struktur entwickelt. Die am häufigsten in der PDT eingesetzte Substanzklasse waren Porphyrin-Derivate, aber auch die Klasse der Chlorine, Derivate des Chlorophyll A, rückten mehr in den Vordergrund. Weiterhin wurden Phthalocyanine eingesetzt, sowie Porphycene [Fritsch et al., 1998b, Pandey et al., 2006].

### **2.2.5 Fertigarzneimittel für die PDT**

In Deutschland sind neben Photofrin® weitere Fertigarzneimittel zur Photodynamischen Therapie zugelassen. Sie alle werden in verschiedenen Therapiegebieten eingesetzt. 2000 kam mit Visudyne® (Verteporfin) ein Fertigarzneimittel auf den deutschen Arzneimittelmarkt, das bei altersbedingter Makula-Degeneration eingesetzt werden kann. Visudyne® ist eine liposomale Lösung zweier isomerer Benzoporphyrin-Derivate im Verhältnis 1:1. Nach Infundierung und Lichtaktivierung mit nichtthermischem Laserlicht (692 nm) besteht der therapeutische Effekt in der Verödung pathologischer Gefäßneubildungen in der Aderhaut des Auges [Fachinformation Visudyne®, 2005, Müller-Velten et al., 2003]. Foscan® mit dem Wirkstoff Temoporfin wurde 2002 zugelassen. Anwendungsgebiet ist die palliative Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Plattenepithel-Karzinom im Kopf- und Halsbereich [Rote Liste, 2006]. Ganz aktuell ist ein Tochterpräparat von Foscan®, das durch Optimierung der galenischen Eigenschaften in bewährten Indikationen Vorteile erbringen soll. Liposomal verpackt soll Temoporfin so schneller in den Interzellulärraum penetrieren können. Unter dem Namen Foslip® wurde in diesem

Jahr eine Zulassungsstudie in den USA gestartet [Hofner, 2006]. 2002 wurde der deutsche Arzneimittelmarkt mit Metvix® bereichert, einer halbfesten Zubereitung, die den Methylester der 5-ALA enthält. Dieses Präparat ist nach topischer Applikation zur Therapie von aktinischen Keratosen und oberflächlichen Basaliomen zugelassen. Auf dem amerikanischen Arzneimittelmarkt existiert eine 20%ige 5-ALA-Zubereitung zur äußeren Anwendung in Form des „Levulan® Kerastick™ for topical solution“. Es handelt sich dabei um ein stabförmiges Zweikammer-System, das aus zwei abgedichteten Glasampullen besteht. In der einen Ampulle ist 5-ALA-Hydrochlorid als Feststoff enthalten, in der anderen wird separat das Lösungsmittel aufbewahrt. Bringt man unmittelbar vor der Anwendung den Inhalt dieser beiden Kammern durch Zerdrücken der Ampullen in Kontakt, resultiert eine 20 %ige 5-ALA-Lösung mit 48 % Ethanol, die „Levulan® Kerastick™ topical solution“ [Berlex Laboratories, 2002], die zur Behandlung aktinischer Keratosen in Kombination mit Blaulicht zugelassen ist.

### **2.2.6 Natürliche Photosensibilisatoren**

Neben den auf dem Arzneimittelmarkt therapeutisch zugelassenen Substanzen existieren weitere natürliche Photosensibilisatoren. Für Fagopyrin und Hypericin als Inhaltsstoffe des Buchweizens respektive des Johanniskrauts sind nach deren Verzehr exanthemische Hautreaktionen bekannt. Weidevieh erlitt Hautschäden nach Sonnenexposition; bei Patienten, die in der Selbsttherapie vegetativer Dystonie zu Johanniskrautpräparaten greifen, ist auf die photosensibilisierende Wirkung dieses Phytopharmakons hinzuweisen. Betacaroten und andere verwandte Carotinoide kommen trotz ihres ausgedehnten chromophoren Systems nicht als Photosensibilisatoren in Frage. Im Gegenteil entschärfen Carotine reaktive Sauerstoffspezies durch Bildung mesomeriestabilisierter Carotin-Radikale und werden somit bei Protoporphyrrie und polymorphen Lichtdermatosen therapeutisch eingesetzt.

Zur Therapie der Psoriasis wird Methoxsalen eingesetzt. Es ist ein halbsynthetisches Derivat der Furocumarine, die in vielen Pflanzen als sekundäre Naturstoffe vorkommen. Nach Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht wird der Wirkstoff aktiviert und hemmt die Zellteilung der unter beschleunigter Hauterneuerung leidenden Zellen [Roth, 2003].

### **2.3 Einsatz von 5-ALA**

Kennedy et al. zeigten zu Beginn der 1990er Jahre, dass eine für gewisse Gewebe spezifische Photosensibilisierung nach Gabe von 5-ALA resultierte. Mit 5-ALA setzte man neuerdings keinen direkt photoaktiven Stoff ein, sondern ein Prodrug, das endogen zum eigentlichen Photosensibilisator, dem Protoporphyrin IX (PpIX) metabolisiert wird und in den zu behandelnden Zellen akkumuliert. Dies warf auch das Einsatzgebiet als selektives Herbizid auf, da nur bestimmte Pflanzen nach Besprühung mit einer 5-ALA-Lösung genug PpIX anhäufte und nach anschließender Sonnenlichtexposition zerstört wurden [Kennedy und Pottier, 1992]. 5-ALA passierte aus wässriger Lösung sehr leicht abnormal verändertes Keratin, während gesunde Keratinzellen 5-ALA nicht aufnahmen [Kennedy et al., 1990]. Ferner hatte man neben dem einen Hauptziel der Erhöhung der Selektivität des Wirkstoffes zu den Zielzellen auch eine Minimierung der kutanen Photosensibilisierung erreicht. Nach systemischer Gabe befindet sich kein bzw. nur geringe Mengen an Photosensibilisator im Blutkreislauf, da PpIX nur in Mitochondrien lebender Zellen gebildet wird. PpIX, das durch oral, intravenös oder topisch verabreichtes 5-ALA induziert wird, ist innerhalb von 24 h aus dem Körper abgebaut [Fritsch, 1996, Iinuma et al., 1994], da es endogen zu nicht fluoreszierendem Häm und Bilirubin metabolisiert wird [Peng et al., 1997b], während die Photosensibilisierung nach Hämatoporphyrin-Derivat-Gabe mindestens 2 Wochen bis zu einigen Monaten bestehen bleibt.

Der ideale Photosensibilisator vereint möglichst viele der folgenden Eigenschaften: Chemische Reinheit, Selektivität für Tumorzellen, chemische und physikalische Stabilität, ein geringes Zeitintervall zwischen Verabreichung und maximaler Akkumulation in den Zielzellen, Aktivierung durch Wellenlängen mit optimaler Eindringtiefe ins Gewebe und eine schnelle Clearance aus dem Kreislauf. Mit 5-ALA scheint ein Wirkstoff gefunden worden zu sein, der viele, aber nicht alle dieser Voraussetzungen erfüllen kann [De Rosa und Bentley, 2000].

### **2.3.1 Topische PDT mit ALA**

Im Gegensatz zu Porphyrinen, die als große Moleküle nicht in der Lage sind, nach topischer Applikation die menschliche Haut zu penetrieren, kann 5-ALA als ein kleines Molekül relativ leicht abnormale Haut durchqueren. Kennedy et al. [1992] zeigten, dass bei topischer Applikation von 5-ALA bei menschlichen Krebspatienten eine starke PpIX-Fluoreszenz in Tumoren induziert wird, die ihren Ursprung in der Epidermis, in den Bronchien, im Brustgewebe und in den Speicheldrüsen haben, sprich in Geweben, die vornehmlich Oberflächen bedecken. Aus diesem Grunde setzte man 5-ALA 20 %(m/m) als O/W-Emulsion zur Behandlung von Basalzellkarzinom, schuppenartigem Hautkarzinom, aktinischer Keratose und bei Morbus Bowen ein und erreichte Remissionsraten von 80-100 % bei oberflächlichen Tumoren [Karrer et al., 1998]. Ferner wurden hervorragende kosmetische Ergebnisse erreicht, denn die behandelte Haut heilte nicht nur narbenfrei ab, sondern es kam sogar zu einer optischen Verjüngung der entsprechenden Hautfläche, so dass in den USA der Begriff Photorejuvenation geprägt wurde [Hofner, 2006].

Die Behandlung von Hauttumoren mit ALA-haltigen Grundlagen wird wie folgt durchgeführt: Zunächst wird das nekrotische oder verhornte Gewebe mit Hilfe eines scharfen Löffels abgetragen, um die Penetration des Wirkstoffes zu erleichtern. Auf die betroffenen Areale wird im Umkreis von 10 mm über die erkennbaren Ränder der Läsion hinaus die ALA-haltige Formulierung aufgetragen. Die Applikationsstelle wird dann für mindestens 3 h luftdicht mit einer speziellen Okklusionsfolie abgedeckt. Anschließend wird die Folie entfernt, die überschüssige Creme abgewischt und die Läsion mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die so vorbereitete Hautstelle wird mit Rotlicht der Wellenlänge 634 nm mit einer definierten Gesamtlichtdosis bestrahlt. Nach einer Woche wird diese Prozedur wiederholt. In der Regel wird nach einer Sitzung zwar schon eine hohe Heilungsrate von z.B. 67 % nach Therapie mit Metvix® Creme erreicht, nach der zweiten Sitzung liegen die Behandlungserfolge mit 90 % allerdings noch höher [Laboratorium Galderma GmbH, 2002].

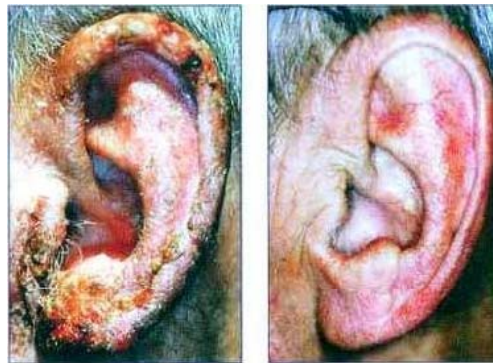


Abb. 2.2: Patient mit Aktinischer Keratose vor (links) und nach (rechts) Behandlung mit Metvix®-PDT

### 2.3.2 Probleme bei Formulierungen mit 5-ALA

Da es sich bei 5-ALA um ein polares, zwitterionisches Molekül handelt, ist seine Penetration durch das humane Stratum corneum per se limitiert. Damit die PDT erfolgreich durchgeführt werden kann, muss allerdings eine ausreichende Menge an 5-ALA das Stratum corneum passieren können. Diese natürlich gegebene geringe Kapazität, biologische Membranen zu überwinden, stellt eine große Herausforderung an den pharmazeutischen Technologen [Lopez et al., 2004].

Bretschko et al. [1996] erreichten einen Flux von  $2,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$  für 5-ALA aus einer 10 %igen Lösung durch exzidiertes humanes SC, der erst nach Überwinden einer Lag-Phase von über 20 h einsetzte. Sie folgerten, dass für eine erfolgreiche topische Applikation von 5-ALA aus diesem System eine Applikationszeit von 24-48 h erforderlich wäre. Im direkten Vergleich zu einem Flux von  $0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$  für Photofrin® bedeutete das zwar einen immensen Unterschied, wäre aber für die Compliance inakzeptabel.

Neben der eingeschränkten Bioverfügbarkeit ist bei Formulierungen mit 5-ALA ihre chemische Instabilität zu beachten, die sich als Funktion der Konzentration, des pH-Wertes sowie der Reaktionszeit manifestiert [Novo et al., 1996]. Granick and Mauzerall [1958] berichteten über die irreversible Dimerisation von 5-ALA zu 2,5-( $\beta$ -carboxyethyl)dihydropyrazin (CHPY) in alkalischer Lösung. Spätere Untersuchungen von Franck und Stratmann [1981] offenbarten, dass die Kondensation zweier ALA-Moleküle in alkalischer Lösung zu zwei Produkten in



einem Verhältnis von 1:10 führt. Die Substanz mit dem geringeren Anteil wurde als Porphobilinogen identifiziert, bei dem vorherrschend entstehenden Stoff handelte es sich um das gelb gefärbte CHPY. Bei weiterführenden Untersuchungen entdeckten Butler and George [1992] drei zyklische Kondensationsprodukte in verschieden gepufferten Lösungen; erstens das Pseudoporphobilinogen, das nur unter anaeroben Versuchsbedingungen nicht enzymatisch katalysiert entsteht, zweitens das bereits von Granick et al. [1958] beschriebene Dihydropyrazin (CHPY), sowie das vorwiegend entstehende 2,5-( $\beta$ -carboxyethyl)pyrazin (CPY). Diese Autoren postulierten, dass CPY als Oxidationsprodukt aus CPHY an der Luft entsteht.

Die bisherigen Studien zeigten, dass 5-ALA in wässriger Lösung, je nach gewählten Versuchsbedingungen, zu verschiedenen Produkten reagieren kann. Diverse Versuche untermauerten die pH-Wert-Abhängigkeit der Instabilitätsreaktion. Sie zeigten, dass hoch konzentrierte 5-ALA-Lösungen eine Gelbfärbung aufwiesen, sobald sie neutralisiert wurden. Elfsson et al. [1998] belegten, dass eine 1 %ige 5-ALA-Lösung (60 mM) bei einem pH-Wert von 2,35 über 37 Tage Versuchszeitraum stabil blieb. Auch 5-ALA-Lösungen zwischen 0,005 und 0,30 M veränderten ihre Azidität bei einem Puffer-pH von 5,2 innerhalb von 300 min nicht, während für die gleiche Lösung bei pH-Werten von 6,3 und 7,4 deutliche Abfälle zu verzeichnen waren [Novo et al., 1996]. Weiterhin wies das Absorptionsspektrum dieser Lösungen zusätzliche Banden im Vergleich zu dem von 5-ALA auf. Die Absorptionsspektren konnten den Substanzen CHPY und CPY zugeordnet werden. In Abhängigkeit von der Azidität der Lösung liegt 5-ALA im Bereich von pH 5 bis 7,5 hauptsächlich als Zwitterion vor, bei pH 5,0 liegen 10 % der Moleküle als Kation vor, bei pH 7,3 10 % als Anion. Für die Kondensation zweier 5-ALA-Moleküle muss die 5-ALA als Anion vorliegen, da nur dort die Aminogruppe deprotoniert und damit zur Reaktion mit der Keto-Gruppe eines weiteren 5-ALA-Moleküls befähigt ist (s. Abb. 2.3)[Gadmar et al., 2002, Novo et al., 1996]. 5-ALA-Lösungen sind folglich nur dann stabil, wenn die Lösung sauer genug ist, und das Anion nicht existiert. Winkler [2005] demonstrierte, dass bei Verwendung eines Phosphatpuffers pH 5,0 [Pharmacopoea Helvetica 1997] über den Versuchszeitraum von 30 h die 5-ALA-Konzentration der Lösung stabil blieb.

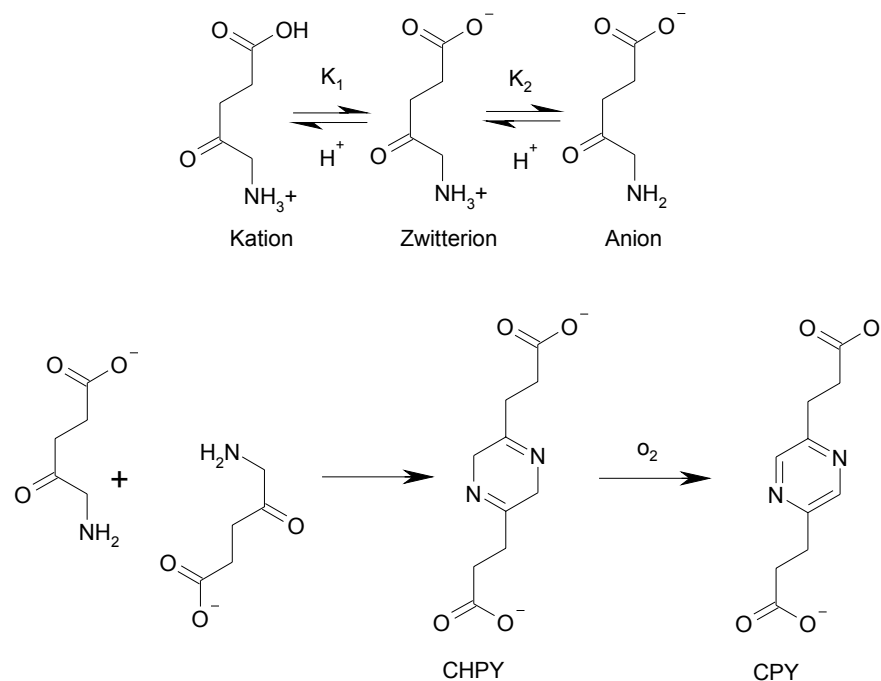


Abb. 2.3: pH-abhängige Dimerisierung von 5-ALA [Novo et al., 1996]

### 2.3.3 Steigerung der Bioverfügbarkeit von 5-ALA nach topischer Applikation

#### 2.3.3.1 Veresterung

Die limitierte Bioverfügbarkeit von 5-ALA in tieferen Schichten der Epidermis zu steigern ist notwendig, um ausreichende Mengen an PpIX für den photodynamischen Effekt zu bilden. Gelingt es nicht, müssen relativ hohe Dosen an 5-ALA über einen langen Zeitraum appliziert werden, was das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen erhöht [Fiedler et al., 1996a] und die selektive Akkumulation im erkrankten gegenüber gesundem Gewebe erschweren würde [Webber et al., 2000]. Peng et al. sowie Kloek und Beijersbergen van Henegouwen [1996] waren daher die Pioniere, die lipophilere 5-ALA-Derivate als Prodrugs zur verbesserten PDT zunächst an Maushaut einsetzten. Sie zeigten, dass dadurch eine Steigerung der Bioverfügbarkeit von 5-ALA erreicht werden konnte: Nach topischer Applikation verschiedener 5-ALA-Ester resultierte eine stärkere PpIX-Fluoreszenz als nach Auftragen der unveränderten Aminosäure

[Peng et al., 1996]. Weitere Versuche ergaben, dass 5-ALA-Ester vergleichbare oder leicht erhöhte Konzentrationen an PpIX im Vergleich zu 5-ALA generieren konnten [De Rosa et al., 2004, Juzeniene et al., 2002]. Im Gegensatz dazu zeigten van den Akker et al. [2000], dass eine kurze Einwirkzeit von 5-ALA (5-60 min) eine höhere Protoporphyrin (PpIX)-Fluoreszenz induzierte als 5-ALA-hexylester. Beide Verbindungen wurden in die Standardcremegrundlage Unguentum M<sup>®</sup> eingearbeitet. Es ist also ersichtlich, dass mit einer Kettenverlängerung des 5-ALA-Esters die Effizienz der PpIX-Bildung nicht zwangsläufig oder gar beliebig steigerbar ist. Substanzen, deren Lipophilie zu groß ist, neigen eher dazu, im Stratum corneum zu akkumulieren [Kloek et al., 1998, Uehlinger et al., 2000]. Wird ihre Lipophilie über einen gewissen kritischen Punkt erhöht, überwiegt ihr Bestreben, in der Zellmembran bzw. im Stratum corneum zu verweilen, und nicht in das Zytoplasma oder zu ihrem Wirkort weiter zu diffundieren. Ein weiterer Punkt, der die Verfügbarkeit der Ester einschränkt, ist die Notwendigkeit ihrer enzymatischen Spaltung, bevor sie in den Biosyntheseweg des Häms eintreten können [Peng et al., 1997b, Uehlinger et al., 2000]

Da die enzymatische Spaltungsrate der Ester mit steigender Kettenlänge des aliphatischen Alkohol-Substituenten abnahm, wurde die Verwendung des 5-ALA-methylesters empfohlen. [Kloek et al., 1998]. Es schien ein Kompromiss gefunden worden zu sein zwischen einer ausgewogenen Lipophilie, ausreichender Löslichkeit in wässrigem Milieu und leicht möglicher Esterspaltung im Zielgewebe.

Nun galt es, die im Zuge der Tierversuche gewonnenen Erkenntnisse an menschlichen Hautverhältnissen zu testen. Winkler [2005] fand nach Derivatisierung von 5-ALA zu ihrem Butylester Steigerungen der Permeationsrate durch humanes Stratum corneum um den Faktor 2 bis 10, je nach verwendeter Grundlage. Aktuellste Studien an gesunder humaner Haut hingegen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Penetrationstiefe von 5-ALA, ihrem Methyl- und Hexylester. 5-ALA war sogar in der Lage, am effizientesten PpIX zu bilden [Juzeniene et al., 2006]. Auch andere Gruppen zeigten dies, wiesen aber darauf hin, dass der 5-ALA-Methylester im Vergleich zu 5-ALA eine relativ höhere Selektivität für keratotisch verändertes gegenüber gesundem Gewebe aufweist [Fritsch, 1998b], was ebenfalls für Maushaut dokumentiert ist [Juzenas et al.,

2002]. Auch in dickere Basalzellkarzinome menschlicher Haut konnte der Methylester besser eindringen als 5-ALA es vermochte [Peng et al., 2001].

### **2.3.3.2 Zusatz permeationsfördernder Substanzen zur Formulierung**

Der einfachste Ansatz, die Permeation von 5-ALA zu fördern, ist die Kombination mit Substanzen wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), Ölsäure oder EDTA, die als bewährte Permeationsverbesserer in der Literatur beschrieben sind [Lopez et al., 2004]. DMSO ist ein aprotisches Lösungsmittel, das nach 2-20 %igem Zusatz zu verschiedenen halbfesten Zubereitungen (W/O-Creme, liposomale Lösung, Vaseline, Lotion) die 5-ALA induzierte PpIX-Akkumulation in Maushaut steigerte [Casas et al., 2000]. Noch effektiver gelang dies in Kombination mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), die durch Komplexierung von Eisen die intrazelluläre Anhäufung von PpIX vermehrt [De Rosa et al., 2000b, Malik et al., 1995]. Auch Ölsäure hat sich 10 %ig im Tierversuch als effektiver Permeationsverbesserer für 5-ALA aus Propylenglykol herausgestellt [Pierre et al., 2006].

### **2.3.3.3 Einsatz physikalischer Methoden**

Physikalische Methoden wie Iontophorese erleichtern die Permeation ionischer Substanzen durch elektrischen Strom. Eine gewisse Steuerung ist möglich, da eine direkte Proportionalität zwischen der Stromstärke und dem Arzneistofftransport durch die Membran vorliegt [Lopez et al., 2004]. Iontophoretischer Transport aus verschiedenen halbfesten oder flüssigen Grundlagen durch Schweinehaut war stets effektiver als passive Diffusion des Arzneistoffes bei Verwendung der gleichen Grundlagen, selbst nach Anreicherung dieser Grundlagen mit bekannten die Permeation verbessernden Substanzen [Lopez et al., 2003, Merclin et al., 2004a]. Ferner zeigten van den Akker et al. [2000], dass nach Entfernen des Stratum corneum bei Mäusen durch sogenanntes Tape-stripping mit herkömmlichem Klebeband die Penetration von 5-ALA, besonders aber die ihres Hexylesters, beschleunigt, und die PpIX-Bildung gesteigert wurde.

### **2.3.3.4 Optimierung der Formulierung**

Neben den bereits erläuterten Möglichkeiten, die 5-ALA-Bioverfügbarkeit in tieferen Schichten der Epidermis zu erhöhen, kommt der Wahl der Formulierung eine ganz besondere Bedeutung zu. Die Beschaffenheit eines Vehikels hat immensen Einfluss auf die Freisetzung und Permeation eines Arzneistoffes: Z.B. permeierte 5-ALA aus einer wässrigen Lösung effektiver durch Maushaut als aus einer gleichprozentigen liposomalen Zubereitung [Pierre et al., 2001]. Typischerweise wird 5-ALA zur topischen Anwendung hauptsächlich in O/W-Cremes eingearbeitet [Merclin et al., 2004b, Morton et al., 2002, Pollock et al., 2004]. Turchiello et al. [2003] stellten ein kubisch flüssigkristallines System bestehend aus 70 % Monoolein und 30 % Wasser mit 2 % 5-ALA zur topischen Applikation vor, in dem der Arzneistoff sehr lange stabil blieb. Die 5-ALA induzierte PpIX-Bildung soll stärker sein als im Vergleich zu einer 20 %igen traditionell eingesetzten Zubereitung. Allerdings sind letztgenannte Ergebnisse bis dato nicht veröffentlicht. Winkler und Müller-Goymann [2005] erkannten die permeationsfördernde Wirkung für 5-ALA durch humanes SC nach Einarbeitung in das Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel, ein schmerzlinderndes und entzündungshemmendes kubisch flüssigkristallines System zur topischen Anwendung. Merclin et al. [2004b] entwickelten eine sogenannte „Schwammphase“, eine flüssige Formulierung aus Propylenglykol, Monoolein und Wasser. Sie besitzt eine bikontinuierliche Struktur aus wässrigen Domänen und Lipid-Bilayern, was ihr einen amphiphilen Charakter verleiht. Diese „Schwammphase“ zeigt vergleichbare Permeationsraten durch Schweinehaut für den 5-ALA-Methylester (m-ALA) in 16 %iger Massenkonzentration wie die bereits auf dem Markt erhältlichen Fertigarzneimittel Unguentum M mit 20 % (m/m) 5-ALA und Metvix® mit 16 % (m/m) m-ALA.

Valenta et al. [2005] entwickelten ein neuartiges kubisches Gel aus verschiedenen Polyethylenglykol-Ethern, Wasser und einer Lipidkomponente. 5-ALA permeierte daraus durch Schweinehaut deutlich effektiver als aus einem herkömmlichen Hydroxyethylcellulosegel. Aus den gleichen Komponenten stellte diese Arbeitsgruppe Pflaster mit einer Carrageen-Matrix her, mit denen eine weitere Steigerung der 5-ALA-Permeation erreicht werden konnte, und in denen

die Arzneistoffkonzentration über 90 Tage stabil blieb, was einen großen Vorteil gegenüber bisher eingesetzten topischen Zubereitungen darstellt.

Da 5-ALA bekanntermaßen zur Dimerisierung in wässrigen Systemen neigt, muss das Augenmerk auch auf ihre Stabilität in Pflastern gerichtet werden. Die Entwicklung von Bioadhäsiva scheint also eine aussichtsreiche Alternative zu sein, mit der ein einheitlicherer Arzneistoffflux bei gleichzeitig hoher Stabilität von 5-ALA, sowie ein größerer Komfort bei der Applikation für den Patienten zu erwarten ist. Lieb et al. [2002] entwickelten selbstklebende Pflaster, die Eudragit® NE und Acetyltributylcitrat (ATBC) in einem Verhältnis von 1:2 enthielten. Die 5-ALA-Permeation erfolgte daraus mit sehr hohen Permeationsraten durch exzidierte humane Epidermis deutlich schneller als aus einem Hydroxyethylcellulosegel und einer lipidhaltigen Grundlage. Allerdings wurde keine Aussage über die 5-ALA-Stabilität gemacht. McCarron et al. [2005] inkorporierten 5-ALA in Pflaster aus wasserfreier Matrix, in der Absicht, die Zersetzung von 5-ALA zu verlangsamen. Nach 200 Versuchstagen war allerdings in den wasserfreien Organogelen fast nur noch die Hälfte der Ausgangskonzentration an 5-ALA nachzuweisen, während in wasserhaltigen bioadhäsiven Pflastern noch ca. 85 % zu finden waren. Im direkten Vergleich zu Porphin® Creme (ALA 20 % (m/m) in Unguentum Merck®, O/W-Creme) zeigten diese wasserhaltigen Pflaster auf Eudragit®-Basis zwar höhere Freisetzungsraten für 5-ALA, jedoch veränderten sie im Laufe des Versuches ihre Größe durch Wasserabsorption aus dem Akzeptor-Kompartiment [McCarron, 2006], was somit eine weitere Optimierung nötig macht.

## **2.4 Potentielle Einsatzgebiete der PDT im Entwicklungsstadium**

Die PDT ist eine vielseitig einsetzbare Methode, was die aktuellen, neu erschlossenen Anwendungsgebiete widerspiegeln [Poljacki et al., 2006]. Waksman et al. [2006] berichteten darüber, dass in ersten Tierversuchen nach Injektion eines neu entwickelten Photosensibilisators durch Einsatz der PDT die Restenosierung von Koronargefäßen bei Schweinen nach künstlicher Gefäßverletzung signifikant gehemmt werden konnte. Die Gefäßwanddicke war im Vergleich zu unbelichteten Kontrollgefäßen signifikant reduziert, während das Gefäßlumen um 50-60 % erweitert war, was einen viel versprechenden Ansatz zur Therapie koronarer Gefäßerkrankungen darstellt und als Alternative zur

Ballonangioplastie mit anschließender Stentsetzung diskutiert wird. Ferner demonstrierten Wood et al. [2006] Erythrosin als Photosensibilisator zur Anwendung in der Mundhöhle zur Eliminierung des Zahnbelag bildenden Bakteriums *Streptokokkus mutans*. Derzeit wird diese Substanz als Tablette oder in Lösung zur Anfärbung von Zahnplaque eingesetzt. Sie gehört zur Stoffgruppe der Xanthene und absorbiert Licht im sichtbaren Bereich. Ihre Fähigkeit, photochemische Reaktionen zu initiieren ist schon seit längerem bekannt; nun wurde belegt, dass Erythrosin nach Aufnahme durch die Bakterien im Zuge einer photodynamischen Therapie im direkten Vergleich mit etablierten Photosensibilisatoren wie Methylenblau und Photofrin® das kariogene Mundbakterium im ersten Falle 5-10 Mal und im letzteren Falle 100 Mal effektiver zerstört. Weiterhin zeigten präklinische *in vitro* und *in vivo*-Tierversuche viel versprechende Ergebnisse in der Behandlung der Osteomyelitis, einer Entzündung des Knochenmarks und schwerwiegenden Erkrankung, die hauptsächlich durch den Keim *Staphylokokkus aureus* verursacht wird. Der Erreger kann sowohl endogen durch andernorts im Körper herrschende Infektionsherde wie z.B. eine Nasennebenhöhlenentzündung eingebracht werden, als auch im Zuge des Einsatzes von Implantaten oder durch offene Knochenbrüche zum Knochenmark gelangen. Nach Injektion einer 5-ALA-haltigen Kochsalzlösung in den Bauchraum von Ratten und Einhaltung einer Wartezeit von 4 h, wurde das infizierte Knochenmaterial transkutan mit Hilfe eines Lasers geeigneter Wellenlänge bestrahlt. Die photobakterizide Wirkung war beträchtlich. Gegenwärtig wird die Osteomyelitis mit Antibiotika therapiert. In Hinsicht auf die stets zunehmende Antibiotika-Resistenz vieler pathogener Keime stellt die PDT aufgrund ihrer Effektivität gegen viele Mikroorganismen eine potentielle Alternative zur Antibiotika-Therapie dar und wird dahingehend weiter optimiert [Bisland et al., 2006].

Auch Akne wird, neuesten Untersuchungen zufolge, wirksam mit der PDT entgegnet. Das für die Pathogenese der Akne verantwortliche *Propionibakterium acnes* bildet selbst auch photosensibilisierend wirkende Porphyrine, so dass Aknepatienten im Gegensatz zu Menschen mit normalem Hautbild ein vermehrtes Aufkommen von photosensibilisierendem Coproporphyrin III im Bereich der entzündeten Hautareale aufweisen. Durch Bestrahlung dieser Hautgebiete mit Blaulicht (405 nm) kommt es zur Anregung der Bakterien-Porphyrine und damit

zur Zerstörung der Bakterien durch die entstandenen freien Sauerstoffradikale. Der Beobachtungszeitraum betrug 3 Monate. Bei allen auf diese Weise behandelten Patienten kam es schon nach wenigen Wochen zu einer Besserung der entzündlichen Pusteln und Papeln, die umso schneller eintrat, je häufiger bestrahlt wurde [Borelli et al., 2005]. Hongcharu et al. [2000] befassten sich mit PDT nach vorangegangener 5-ALA-Applikation auf die Haut. Sie konnten eine höhere PpIX-Konzentration in Akneläsionen als in umliegendem Gewebe nachweisen und zeigten, dass topisch applizierte 5-ALA eine bevorzugte Anhäufung von Protoporphyrinen in Propionibakterien bewirkt. Nach einmaliger Bestrahlung der Akneläsionen mit Rotlicht kam es vorübergehend zu einer Verschlimmerung der Symptome, danach besserte sich das Hautbild, was mindestens 10 Wochen anhielt. Nach mehrmaliger Bestrahlung besserten sich die Aknesymptome sogar mindestens 20 Wochen. Die Wirksamkeit der topischen ALA-PDT mit kaltem Rotlicht beruht einerseits auf der Zerstörung der im Bereich der Talgdrüsenfollikel lokalisierten Bakterien, wodurch die Entzündung der Follikel eingedämmt wird. Andererseits kommt es zu einer gewünschten verminderten Talgproduktion, die allerdings auf Veränderung und Zerstörung der Talgdrüsen basiert. Neben vorübergehenden Nebenwirkungen wie Ödembildung oder Juckreiz stellten Erythembildung, Hyperpigmentierung und teilweise auftretende Abschilferung der Epidermis erhebliche unerwünschte Nebeneffekte dieser Behandlung dar, die in der Blaulichttherapie nicht auftraten. Der Vorteil einer PDT-Therapie von Akne gegenüber Antibiotika ist, dass keine Resistenzen zu erwarten sind.

Verschiedene Forschergruppen berichten darüber, dass 5-ALA neben einer Reihe von Hauttumoren auch Talgdrüsen penetriert, sowie direkt in Haarfollikel eindringen kann [Gold et al., 2004, Hongcharu et al., 2000]. Es liegt also nahe, dass Uebelhover et al. ein enormes Potential in der PDT zur permanenten Entfernung von Haaren sehen. Damit eignet sie sich prinzipiell zur Behandlung des Hirsutismus, dem Krankheitsbild der übermäßigen Behaarung bei Frauen. Nach topischer 5-ALA-Applikation und anschließender Bestrahlung wurde gezeigt, dass der Haarwuchs nach 1 Monat um die Hälfte zurückgegangen war im Vergleich zu unbehandeltem Hautareal [Colussi et al., 1998]; eine frühere Studie belegte eine 40 %ige Haarwuchsreduktion für 6 Monate nach einer einzigen Behandlung [Grossmann et al., 1995]. Obwohl einige Patienten noch Jahre später



keinen wieder auftretenden Haarwuchs aufwiesen, hat sich diese Methode noch nicht routinemäßig etabliert, da erhebliche unerwünschte Wirkungen wie Schmerz, postinflammatorische Hyperpigmentierung und Epidermisschäden die Compliance der Patienten einschränken [Uebelhover und Dover, 2005].

Mit kurzen Einwirkzeiten für 5-ALA ( $< 1$  h) und für die Anwendung von modifizierten Lichtquellen wird die PDT neuerdings für kosmetische Effekte eingesetzt. Wie schon unter 2.3.1 erwähnt, wurde nach topischer 5-ALA-PDT und Abheilung der behandelten Hautareale ein optischer Verjüngungseffekt festgestellt. Mit sogenanntem „intense pulsed light“ (IPL), das ein Lichtspektrum von 515 nm bis in den nahen Infrarotbereich umfasst, wird das mit 5-ALA vorbehandelte Gesicht bestrahlt. Neben dem 5-ALA induzierten photodynamischen Effekt kommt es zu einer Hitze bedingten Beeinflussung von Gefäßen, Pigmenten und Kollagen. Es resultieren deutliche Verbesserungen der Hauttextur bzw. Faltenreduzierung, verringerte Pigmentierung und eine generell verminderte Hautrötung [Gold et al., 2004, Uebelhover und Dover, 2005]. Somit hat die PDT eine Nische in der kosmetischen Dermatologie etabliert, und es ist zu erwarten, dass diese Anwendung weiter hinsichtlich der Wahl der Lichtquelle, der Dauer der Bestrahlung und Einwirkzeit der photosensibilisierenden Substanz optimiert wird [Babilas et al., 2005, Ibbotson et al., 2006]. Ferner findet die PDT auch ihren Einzug in das Gebiet der ästhetischen Körperformung. Die Firma Biolitec AG bietet neuerdings ein Gerät namens LaEvita™ zur Behandlung von Cellulite an. Es handelt sich dabei um einen vielseitig einsetzbaren Laser, der den in das Unterhautfettgewebe injizierten Photosensibilisator Temoporfin aktiviert. Dort soll der Wirkstoff verschiedene Zellkomponenten modulieren, was zu einer besseren Durchblutung des Gewebes und zur Straffung der Haut führen soll [Biolitec AG, 2006, Neuberger, 2006].

Die in den letzten Jahren enorm expandierte Bandbreite des Einsatzgebietes der 5-ALA-PDT macht deutlich, welch hohen Stellenwert sie folglich in den kommenden Jahren einnehmen wird. Vor allem schwere Formen der Akne, Gesichtsverjüngungen und Hautkrebs sind die Hauptbehandlungsziele. In Fachkreisen wird sie als Behandlung der Zukunft bezeichnet und selbstbewusst die Frage gestellt, ob Hautkrebs bald nur noch eine Erinnerung für die früher dadurch Gepeinigten bleibt... [Gold et al., 2004]

## 2.5 Haut

### 2.5.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

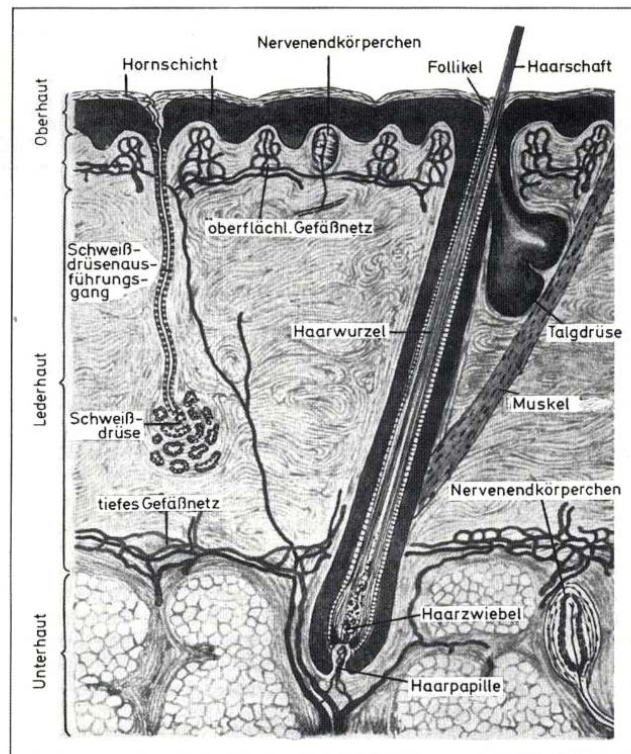


Abb. 2.4: Aufbau der menschlichen Haut [Raab und Kindl, 1999]

Die menschliche Haut stellt mit ca. 2 m<sup>2</sup> das größte unserer Körperorgane dar. Sie setzt sich aus drei histologisch voneinander abgrenzbaren Schichten zusammen: Die Oberhaut, auch Epidermis genannt, stellt die eigentliche Schutzschicht des Körpers gegen die Umwelt dar. Ihre oberste Schicht besteht aus mehreren Zellschichten verhornter Keratinozyten, wodurch sie das Eindringen der meisten Fremdstoffe verhindern kann und den Körper vor Feuchtigkeitsverlust schützt. An die Epidermis schließt sich eine elastische Faserbindegewebsschicht an, die auch als Lederhaut oder Dermis bezeichnet wird und deren Hauptaufgabe neben der Versorgung der Epidermis im Schutz vor reibenden und scheren Einflüssen besteht. Darunter liegt die Unterhaut aus lockerem Bindegewebe, in die mehr oder weniger Fettzellen eingelagert sein können. Dadurch fungiert sie als Wärmeschutz und mechanische Polsterung, sowie als Speicher für Nährstoffe und Wasser. Weiterhin kommen der Haut

vielfältige Stoffwechselfunktionen zu, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen wird, da sie eingehend in der Literatur thematisiert wurden [Brinkmann, 2006, Kindl und Raab, 1993, Winkler, 2005].

### **2.5.2 Aufbau der Epidermis**

Nur in der untersten Schicht der Epidermis, in der Basalzellschicht (Stratum basale), findet die Bildung von Zellen, sogenannter Keratinozyten, statt. Keratinozyten enthalten ein Stabilität und Form gebendes Skleroprotein, das Keratin. Durch permanent neu gebildete Zellen werden sie innerhalb eines Monats nach oben in Richtung Hautoberfläche geschoben und durchlaufen währenddessen mehrere Entwicklungsstadien, bis sie als tote, abgeflachte Hornzellen die oberste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum, bilden.

Die Übergänge zwischen den einzelnen Schichten der Oberhaut sind fließend, da die Dynamik der permanenten Zellerneuerung eine präzise Abgrenzung unmöglich macht. An die Basalzellschicht schließt sich die Stachelzellschicht (Stratum spinosum) an, in der die Zellen sich zu differenzieren beginnen und ein charakteristisches stacheliges Aussehen annehmen. Hier beginnt auch die Bildung der sogenannten „Odland bodies“ in den Keratinozyten. Es handelt sich bei ihnen um kleine ovale Organellen, die eine Reihe hydrolytischer Enzyme und Lipide enthalten, die später die Lipidmatrix der obersten Hautschicht bilden [Odland, 1960, Schurer und Elias, 1991].

Auf die Stachelzellschicht folgt die Körnerzellschicht (Stratum granulosum), deren Zellen nun harte Eiweißkörper mit körnchenartiger Struktur erkennen lassen, was auf die beginnende Verhornung der Keratinozyten und damit den baldigen Zelltod hinweist. Während in dieser Schicht die porenbildenden Verbindungsproteine der gap junctions verschwinden, sind vermehrt Desmosomen zu finden [Elias, 1981]. Diese in den Zellmembranen lokalisierten Strukturen fungieren als mechanischer Anker zwischen nebeneinander liegenden Zellen und stellen den besonders engen Zusammenhalt der Epidermiszellen sicher. In stark mechanisch beanspruchten Körperregionen wie am Fuß und an den Handinnenflächen schließt sich an das Stratum granulosum die Glanzschicht (Stratum lucidum) an, die dann in die mehrschichtige Hornschicht (Stratum corneum) übergeht [Kindl und Raab, 1993, Raab und Kindl, 1999].

### **2.5.3    Aufbau des Stratum corneum**

Das Stratum corneum macht etwa 40 % der Gesamtdicke der Oberhaut aus und besteht je nach Körperregion aus mindestens 10-20, an manchen Stellen bis zu 100 Lagen dicht aufeinandergepackter Hornzellen. Je näher eine Zelllage an die Oberfläche gelangt, desto lockerer wird ihr Zellverband, und es kommt zur kontinuierlichen Abschilferung von Teilen der obersten Deckschicht in Form feiner Schüppchen. Dies ist möglich durch Einwirkung verschiedener Enzyme auf die Halt gebenden Desmosomen und interzellulären Lipide im sogenannten Stratum corneum disjunctum [Forslind, 1994]. Im darunter liegenden Stratum corneum conjunctum sind die Zellen durch noch intakte Desmosomen, die als Haftplatten zwischen den einzelnen Epithelzellen fungieren, dichter gepackt [Loth, 1986]. Die im Stratum corneum befindlichen kernlosen Keratinozyten sind tot und werden als Korneozyten bezeichnet. Sie sind eng verzahnt und in eine Lipidmatrix aus 25% Cholesterol, 25% Palmitinsäure, 40% Ceramiden sowie 10% Cholesterolsulfat eingebettet [Raab und Kindl, 1999], wobei diese Angaben je nach Autor variieren.

Auffällig ist das Fehlen von Phospholipiden, die sonst einen Hauptbestandteil von Membranen darstellen [Elias, 1990, Wertz und Downing, 1989a]. Das Lipidgemisch wird durch die sogenannten Odland bodies in den Interzellularraum sezerniert. Dort reorganisiert es sich zu multilamellaren Bilayerstrukturen. Zeitgleich verdrängen und zerstören in den Keratinozyten akkumulierte Keratin-Filamente und assoziierte Matrixproteine die übrigen Zellorganellen, was zum Zerbersten der Zellen führt [Wertz und Downing, 1989a]. Der Aufbau des Stratum corneum kann zur Verdeutlichung mit dem sogenannten „Backstein-Mörtel-Modell“ beschrieben werden [Elias, 1983]. Die Ziegelsteine repräsentieren die Korneozyten, während der Mörtel die Kittmasse aus mehreren Lipid-Wasser-Doppelschichten darstellt. Das interzelluläre Lipidgemisch liegt geordnet in Form von Doppelschichten vor, in denen sich polare wässrige Bereiche, in die die Kopfgruppen der Fettsäuren hineinragen, mit lipophilen abwechseln, die durch die Alkylketten der Fettsäuren gebildet werden [Ziegenmeyer, 1989]. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen polaren Kopfgruppen und hydrophoben Alkylketten garantieren dieser Struktur Halt, was ferner durch die Anwesenheit der Ceramide unterstützt wird. Dieses Sphingolipid durchspannt die Doppelschicht, wodurch es dem Stratum corneum zusätzlich Festigkeit verleiht

und daher als Ordnungsfaktor gilt [Landmann, 1991]. Das Stratum corneum schützt also zum Einen tiefere Gewebeschichten vor Austrocknung und verhindert zum Anderen das Eindringen schädlicher Substanzen aus der Umgebung.

#### **2.5.4 Mikrostruktur des Stratum corneum**

Die Lipidbarriere des Stratum corneum ist essentiell, um die Haut vor übermäßigem transepidermale Wasserverlust zu schützen. Dies belegten Sweeney und Downing nach einer Extraktion der Lipide durch verschiedene Lösungsmittel [Sweeney und Downing, 1970]. Veränderungen in der Mikrostruktur der Lipidmatrix des Stratum corneum gehen mit erhöhter Permeabilität einher [Golden et al., 1987] und können mittels röntgenanalytischer und differenzkalorimetrischer Messungen erkannt werden. Abb. 2.5 zeigt ein typisches Beispiel für das thermische Verhalten von exzidiertem humanen Stratum corneum. Zwischen 30 und 120 °C erfolgen vier charakteristische endotherme Phasenübergänge. Der erste endotherme Phasenübergang bei ca. 40 °C wird durch die Umwandlung von orthorhombisch angeordneten Lipiden zu einer hexagonalen Packung verursacht [Bouwstra et al., 1993], ohne die Fernordnung der Lipidlamellen zu beeinflussen. Dies wurde durch temperatur abhängige Röntgenuntersuchungen belegt [Bouwstra et al., 1992]. Bei ca. 70 °C schmelzen die lamellaren Lipidschichten und verlieren ihre Ordnung. Die auf lateraler Ebene hexagonal angeordneten Lipide gehen in den flüssigen Zustand über [Silva et al., 2006b]. Die beiden Phasenübergänge bei 40 °C und 70 °C sind reversibel. Der 3. Phasenübergang bei ca. 85 °C beruht auch auf einem Übergang der Lipide vom Gel- in den flüssigen Zustand, allerdings sind diese Lipide mit Protein assoziiert [Silva et al., 2006a], da der Phasenübergang nach Überschreitung der Denaturierungstemperatur des Keratins irreversibel wird. Der vierte Phasenübergang bei ca. 110 °C ist irreversibel und damit auf die Denaturierung von Proteinen zurückzuführen [Bouwstra et al., 1991, Golden et al., 1986].

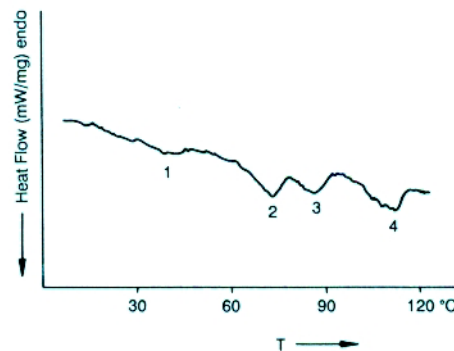


Abb. 2.5: Thermogramm von exzidiertem humanen Stratum corneum [Bouwstra et al., 1993]

Generell sind Phasenübergänge von Wasser und Lipid-Schmelzen umkehrbar, während Reversibilität bei Proteindenaturierungsübergängen nicht möglich ist [van Duzee, 1975]. Der Wassergehalt des Stratum corneum hat einen deutlichen Einfluss auf die Phasenübergangstemperaturen der Lipide. Ist das SC zu weniger als 15 % hydratisiert, kann der Proteinpeak bei 110 °C nicht beobachtet werden. Steigt der Wassergehalt des Stratum corneum an, erscheinen die Lipidumwandlungen bei geringeren Temperaturen [Bouwstra et al., 1991, Golden et al., 1986]. Die Interaktion des Wassers mit den polaren Kopfgruppen der Lipide geht mit einer Lockerung der Packung einher, wodurch Bindungskräfte zwischen Kohlenwasserstoffketten verringert werden und der Phasenübergang mit weniger Energie möglich ist, ergo bei geringeren Temperaturen auftritt [Golden et al., 1986].

Untersuchungen mit Röntgenkleinwinkelstreuung belegen die Ko-Existenz zweier Lamellarphasen innerhalb der Lipidmatrix des Stratum corneum, da Netzebenenabstände von 6,4 und 13,4 nm erhalten werden [Bouwstra et al., 1993], wovon die Lamellarphasen mit dem größeren Netzebenenabstand von entscheidender Bedeutung für die Barrierefunktion des Stratum corneum ist [Bouwstra et al., 2002]. Röntgenweitwinkeluntersuchungen an humanem Stratum corneum offenbaren zwei scharfe Reflexe bei ca. 0,414 und 0,372 nm und zwei diffuse Banden bei ungefähr 0,46 und 0,98 nm [Bouwstra et al., 1992, 2001, Cornwell et al., 1994, Garson et al., 1991]. Die Interferenzen bei 0,414 und 0,372 nm werden auf kristalline Lipidbilayerstrukturen des

Interzellularraumes in orthorhombischer Anordnung zurückgeführt. Da eine Interferenz bei 0,414 nm ebenfalls charakteristisch für gelockert angeordnete Gelphasenlipide in hexagonaler Ausrichtung ist, existieren nebeneinander sowohl kristalline als auch Gelphasenlipide im Stratum corneum [Cornwell et al., 1994, Bouwstra et al., 2002, Pilgram et al., 1999, Small et al., 1988]. Diese Reflexe verschwinden nach Lipidextraktion nicht völlig, daher wird ein Teil der Lipide kovalent mit der Korneozytenmembran verbunden sein [Wertz et al., 1989b]. Die als Hydroxyacylsphingosine detektierten Lipide umhüllen in enger Packung die Korneozyten und formen ein sogenanntes „lipid envelope“ [Swartzendruber et al., 1987]. Die breiten diffusen Signale bei 0,98 und 0,46 nm werden dem Korneozyten-Keratin zugeordnet [Garson et al., 1991]. Da das erhaltene Beugungsmuster für Keratin sehr schwach ausgeprägt ist, kann eine präzise Zuordnung zu einer bestimmten Konformation nicht mit absoluter Sicherheit vorgenommen werden [Cornwell et al., 1994]. Gemäß Garson et al. [1991] stimmt das Muster am ehesten mit dem für  $\beta$ -Keratin überein.

### **2.5.5 Arzneistoffpermeation durch das Stratum corneum**

Aufgrund des in 2.5.3 erläuterten Aufbaus des Stratum corneum ergeben sich für einen Arzneistoff im Wesentlichen zwei mögliche Penetrationswege. Dabei hängt die Wahl der Route entscheidend von den physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffes ab, seinem Verteilungskoeffizienten an den Übergängen zu den einzelnen Schichten, sowie dem Diffusionskoeffizienten in den verschiedenen Bereichen. Stoffe mit einem Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten von 1, die also gleichermaßen gut löslich in Wasser und Öl sind, permeieren am besten [Landmann, 1991]. Während lipophile Stoffe über den interzellulären Weg das Stratum corneum passieren, bei dem sie um die Korneozyten herum durch die bimolekulare Schicht der Alkylketten diffundieren, bevorzugen polare Substanzen den transzellulären Weg abwechselnd durch die Korneozyten und durch die Lipidschichten. [Barry, 1987, Neubert et al., 1996]. Die Penetration über Haarfollikel, Talg und Schweißdrüsen ist eher unbedeutend, da ihr Anteil am Gesamtvolumen der Hornschicht mit 0,01 bis 0,1 % relativ gering ist [Ziegenmeyer, 1989]. Für Ionen wird ein anderer Weg als für ungeladene Moleküle angenommen. Sie passieren das SC über Poren, sogenannte Shunts [Bach und Lippold, 1998].

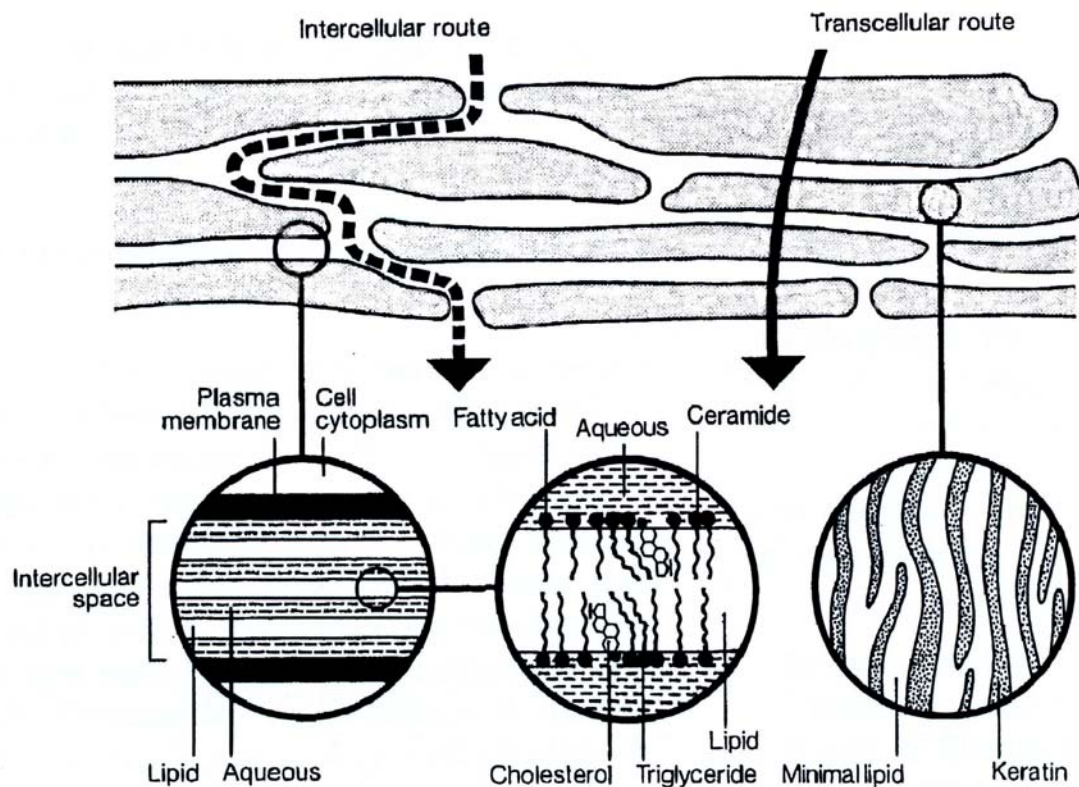


Abb. 2.6: Mögliche Penetrationswege eines Arzneistoffs durch das Stratum corneum [Barry, 1987]

### 2.5.6 Permeationsförderung durch das Stratum corneum

Das Stratum corneum birgt also aufgrund seines strukturellen Aufbaus für exogene Substanzen erhebliche Schwierigkeiten, es zu durchqueren. Verbesserung der Permeation eines Arzneistoffes kann durch den Einsatz physikalischer Methoden (s. 2.3.3.3) oder auf dem chemischen Wege durch Zusatz penetrationsfördernder Substanzen zum Vehikel erreicht werden, was in diesem Kapitel vorrangig thematisiert wird. Diese Substanzen sind in der Lage, die Mikrostruktur des Stratum corneum so zu beeinflussen, dass es für einen gewissen Zeitraum durchlässiger wird. Sie sollten kein irritatives oder allergenes Potential besitzen und nach ihrem Absetzen sollte die Barrierefunktion der Haut möglichst schnell wieder hergestellt sein. Diese permeationsfördernden Stoffe können durch Angriff an den Lipidstrukturen, Modifikation des intrazellulären Keratins oder durch Löslichkeitsverbesserung des Permeanden in Aktion treten [Barry, 1991]. Innerhalb des interzellulären Penetrationsweges können sie mit



den polaren Kopfgruppen der Lipide im hydrophilen, wässrigen Abschnitt interagieren. Dadurch verändert sich deren Hydratationszustand und beeinflusst ihre Wechselwirkungen untereinander. Die Folge ist ein erhöhtes Volumen an chemisch nicht gebundenem Wasser in den Doppelschichten, wodurch es zu einer Fluidisierung und Permeationsverbesserung für polare und apolare Substanzen kommt, da auch die lipophilen Bereiche ungeordneter und damit durchlässiger werden. Ferner können sich Permeationsmodulatoren direkt in die hydrophoben Doppelschichten zwischen die Alkylketten der Lipide einlagern und dort deren Packung beeinflussen [Neubert et al., 1996], was die Durchlässigkeit erhöht. In den Korneozyten wird die Proteinmatrix vor allem durch Hydratisierung beeinflusst. Wasser kann hier als permeationsfördernder Stoff eingreifen, indem es sich zunächst an die funktionellen Gruppen der Keratinfibrillen anlagert und so die Proteinketten hydratisiert. Auf diese Weise werden die intermolekularen Wechselwirkungen reduziert. Bei weiterer Wasseraufnahme beginnen die Korneozyten zu quellen und erscheinen als wässriges Protein-Gel, das eindringenden Substanzen die Passage erleichtert [Barry, 1987, Ziegenmeyer, 1989]. Wasser als Enhancer beeinflusst in erster Linie die Korneozyten und nicht die Lipidroute, da sich nach Hydratisierung die Netzebenenabstände nicht ändern [Bouwstra et al., 1993].

Polare und kleine Permeationsverbesserer wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF) und N-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP) ersetzen in erster Linie Protein gebundenes Wasser innerhalb der Keratinozyten. In höheren Konzentrationen zerstören sie durch Interaktion mit den polaren Kopfgruppen der Lipide deren Organisation. Auch Alkohole agieren auf diese Weise. Permeanden können somit durch Auflockerung der Bilayerstrukturen freier diffundieren. Eine oberflächenaktive Substanz wie Natriumlaurylsulfat interagiert stark mit den Keratin-Ketten und erleichtert damit ebenfalls die polare Route durch die Keratinozyten. Lipophile Moleküle wie Azone werden interkalierend zwischen den Lipidketten eingebaut und erleichtern die Permeation durch die nun weniger starren Bereiche [Bach und Lippold, 1998, Barry, 1987].

### 2.5.7 Quantifizierung der Arzneistoffpermeation durch Stratum corneum

Die Arzneistoffpermeation durch das Stratum corneum ist ein diffusionskontrollierter Prozess. Die effektiv pro Zeit- und Flächeneinheit diffundierte Arzneistoffmenge durch das Stratum corneum kann mittels des Arzneistofffluxes  $J$  [g/cm<sup>2</sup>s] quantifiziert werden. Voraussetzung dafür ist das Vorliegen von perfect-sink-Bedingungen. Dies ist sichergestellt, solange die Arzneistoffmenge im Akzeptorkompartiment Werte von 10 % der Sättigungskonzentration des Arzneistoffes während der Dauer des Permeationsexperimentes nicht übersteigt [Higuchi, 1962]. Liegt also ein konstanter Massenstrom pro Zeit, der steady state vor, kann der Arzneistoffflux  $J$ , basierend auf dem Fickschen Diffusionsgesetz, mit folgender Gleichung mathematisch beschrieben werden [Flynn et al., 1974].

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D_s c_0 K}{h}$$

Gleichung 2-1

$D_s$  = scheinbarer Diffusionskoeffizient in der Haut [cm<sup>2</sup>/s]

$c_0$  = Ausgangskonzentration des Arzneistoffes im Donator [g/cm<sup>3</sup>]

$K$  = Verteilungskoeffizient Haut/Donator

$h$  = effektive Hautdicke [cm]

Als Vergleichsgröße zur Beurteilung der Permeation verschiedener Arzneistoffe durch Barrieren wie das Stratum corneum wird auch der Permeationskoeffizient  $P$  [cm/s] herangezogen. Er ist definiert über folgende Beziehung:

$$P = \frac{D_s K}{h}$$

Gleichung 2-2

Da die Dicke der Hautprobe sowie der Verteilungskoeffizient des Arzneistoffes zwischen Haut und Donator einer Bestimmung nur schwer zugänglich sind, werden Gleichung 2-1 und Gleichung 2-2 folgendermaßen zusammengefasst:

$$P = \frac{J}{c_0}$$

Gleichung 2-3

Trägt man die Menge des pro Membranfläche permeierten Arzneistoffes über der Versuchsdauer in einem Diagramm auf, kann der Flux direkt als Steigung aus dem linearen Kurventeil abgelesen werden. Unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentration erhält man nun den Permeationskoeffizienten.

Inhaltsverzeichnis

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

- 5-Aminolävulinsäure (5-Amino-4-oxopentansäure), wurde für alle Untersuchungen als Salz in Form seines Hydrochlorides ( $M_{(C_5H_{10}ClNO_3)} = 167,6 \text{ g/mol}$ ) eingesetzt. Bei diesem Arzneistoff handelt sich um ein weißes, geruchloses Pulver mit einem Schmelzpunkt von 150-156 °C, das freundlicherweise von der Firma Medac GmbH (D-Wedel) als sterile, gefriergetrocknete Substanz zur Verfügung gestellt wurde. Im nachfolgenden Text wird es als 5-ALA abgekürzt.
- Poloxamer 407 (Pluronic® F 127, Lutrol® F 127) ist ein hydrophiles, oberflächenaktives Polyoxyethylen-polyoxypropylen-Blockpolymer mit einem Molekulargewicht von 12600 und einem HLB-Wert von 22 [Kabanov et al., 2002]. In der Polymerkette wechseln sich hydrophile Ethoxy-Blöcke mit hydrophoben Propoxy-Einheiten ab. Durch die Ausbildung von Mizellen in wässriger Lösung eignet es sich exzellent zur Solubilisierung vielerlei Arzneistoffe. Ferner werden Poloxamere aufgrund ihrer geringen Toxizität und ihrer hohen kosmetischen Akzeptanz als topische Gelformulierung eingesetzt. Sie bilden klare Gele in wässrigen Medien. Das verwendete Poloxamer wurde durch die Firma Dolorgiet (D-St. Augustin/Bonn) zur Verfügung gestellt.

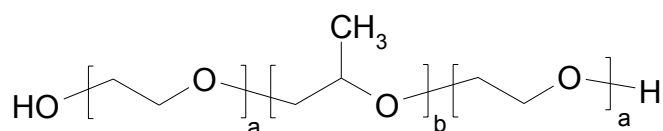


Abb. 3.1: Strukturformel von Poloxamer 407;  $a = 98$ ,  $b = 67$  [Fiedler, 1996]

- Miglyol 840 (mittelkettige Triglyzeride, MCT) ist die Handelsbezeichnung des Propylenglykoldiesters der Capryl- und Caprinsäure und wurde durch die Firma Merck KGaA (D-Darmstadt) bezogen. Dieses nahezu farblose, geruchs- und geschmacksneutrale dünnflüssige Öl gilt als sehr hautverträglich und wird im Folgenden mit MCT abgekürzt. Es fungiert als Penetrationsverstärker in halbfesten Zubereitungen.

- Dimethylisosorbid (DMIS) fungiert als Lösungsvermittler für viele organische Substanzen und ist mit Wasser sowie den meisten organischen Lösungsmitteln mischbar. Es stellt den Dimethylether des Anhydrids eines Sorbit-Isomeren mit der Summenformel  $C_8H_{14}O_4$  dar und wurde durch die Firma Dolorgiet (D-St. Augustin/Bonn) zur Verfügung gestellt.
- Isopropylalkohol (IPA) als Lösungsmittel und Penetrationsverbesserer wurde mit einem Reinheitsgrad von 99 % verwendet und über Merck KGaA (D-Darmstadt) bezogen.
- Puffer wurden mit Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat und Natriumacetat-trihydrat nach Vorschrift der entsprechenden Arzneibücher hergestellt. Die Substanzen wiesen die geeignete Qualität (pro analysi) auf. Der pH-Wert wurde nach Herstellung des Puffers überprüft und, falls notwendig, korrigiert.
- Dolgit® Mikrogel ist ein halbfestes Fertigarzneimittel zur kutanen Anwendung, das 5 %ig den schmerz- und entzündungshemmenden Arzneistoff Ibuprofen enthält. Das durch die Firma Dolorgiet (D-St. Augustin/Bonn) hergestellte Gel wurde aus einer deutschen Apotheke erworben.
- Probiol® N 03031 ist eine Creme-Grundlage der Firma Kuhs GmbH (D-Lörrach), die auf der Zusammensetzung der menschlichen Hautlipide basiert. Es setzt sich aus ca. 10 % Lipiden zusammen (Triglyzeride gesättigter Fettsäuren der Kettenlänge  $C_8$ - $C_{10}$ , Shea-Butter, 2,6,10,15,19,23-Hexamethyltetracosan, Phospholipide) und ca. 93 % 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholin.
- Wasser wurde ausschließlich in bidestillierter Qualität verwendet.
- Sonstige Materialien, die lediglich bei einzelnen Methoden verwendet wurden, werden in dem entsprechenden Kapitel vorgestellt und erläutert.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Manuelle Herstellung der Rezepturen**

#### **3.2.1.1 Basiscreme DAC**

Zur Herstellung der Basiscreme DAC wurden gemäß der Vorschrift des Deutschen Arzneimittelcodexes [DAC, 2006] der Emulgator Glycerolmonostearat 60 (Caelo, D-Hilden), der Strukturgeber Cetylalkohol (Henkel, D-Düsseldorf), die mittelkettigen Triglyzeride, das weiße Vaseline (Merkur Vaseline, D-Hamburg), der Emulgator Macrogol-1000-glycerolmonostearat (Caelo, D-Hilden), das Feuchthaltemittel Propylenglykol (BASF, D-Ludwigshafen) und Wasser verwendet.

#### **3.2.1.2 Wasserhaltige Hydrophile Salbe**

In Anlehnung an die Vorschrift des Deutschen Arzneibuches 2006 [DAB, 2006] wurde die Wasserhaltige Hydrophile Salbe hergestellt, indem emulgierender Cetylstearylalkohol, dickflüssiges Paraffin und weißes Vaseline gemeinsam aufgeschmolzen wurden. Anschließend wurde in der Schmelze das auf die gleiche Temperatur gebrachte gereinigte Wasser zugefügt und bis zum Erreichen von Raumtemperatur gerührt. Verdunstetes Wasser wurde nach dem Erkalten ergänzt.

#### **3.2.1.3 Entwicklung der Rezeptur des Thermogels**

Die Formulierung des Thermogels stellt eine Weiterentwicklung der poloxamerhaltigen Zubereitungen nach Winkler dar [2005, Winkler und Müller-Goymann, 2005]. In Anlehnung an das ibuprofenhaltige Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel, wurden zur Optimierung der durch Winkler vorgestellten flüssigen Grundlagen im Laufe dieser Arbeit neben Poloxamer 407 die Substanzen Dimethylisosorbid, Isopropylalkohol, mittelkettige Triglyzeride und Wasser verwendet. Ziel war die Entwicklung einer halbfesten, gelartigen Zubereitung ohne den antiinflammatorisch wirksamen Arzneistoff Ibuprofen. Empirische Vorversuche, die in dieser Hinsicht Aussicht auf Erfolg versprachen, ergaben ein optimales Mengenverhältnis von Poloxamer zu mittelkettigen Triglyzeriden von 4:1, sowie ein Mengenverhältnis von DMIS zu IPA von 1:1.

Diese Vormischungen und der Wasseranteil wurden im Zuge der Entwicklung der Rezeptur anteilmäßig variiert. Dazu wurden die jeweiligen Komponenten in eine Unguator®-Kruke eingewogen und für 1,5 Minuten bei 1450 Umdrehungen pro Minute (UPM) bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Aufgrund des hohen mechanischen Energieeintrages und der damit verbundenen Erwärmung erfolgte die Gelierung in situ.

Abweichend von dieser Methode können alle Ingredienzien bis auf die Fettkomponente in ein fest verschließbares Gefäß eingewogen und über mehrere Stunden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden, bis sich alles löst, danach kann die Fettkomponente zugefügt und bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Rühren gewartet werden, bis die Gelierung einsetzt. Dies führt zum gleichen Ergebnis, nimmt aber erheblich mehr Zeit und Aufwand in Anspruch.

### **3.2.2 Einarbeitung von 5-ALA in die Grundlagen**

Nach Herstellung der entsprechenden Grundlage wurde 5-ALA mit dieser zusammen in eine Unguator®-Kruke eingewogen und für 1,5 Minuten bei 1450 UPM mit Hilfe des Unguators® gerührt.

### **3.2.3 Rheologische Untersuchungen**

Rheologische Untersuchungen wurden bis auf die Fließgrenzenbestimmung im Oszillationsmodus mit einem CVO 50 Rheometer (Bohlin, D-Bamberg) durchgeführt. Das schubspannungsgesteuerte Gerät war mit einer Kegel-Platte-Scherapparatur mit einem Kegelöffnungswinkel von 1° und einem Durchmesser des Kegels von 40 mm ausgestattet. Zur Messung wurde eine ungefähre Masse von 2,5 g auf die Platte aufgetragen. Um die Verdunstung flüchtiger Substanzen aus der Grundlage zu vermeiden, wurde eine Lösemittelfalle eingesetzt. Die Bestimmung des viskoelastischen Bereiches erfolgte im Oszillationsmodus isotherm bei 20 °C. Zunächst wurde die Probe dafür einem Amplitudensweep unterworfen. Nach Auswahl der geeigneten Schubspannung wurde ein Frequenzsweep angeschlossen, um die geeignete Messfrequenz zu evaluieren. Temperatursweeps wurden durchgeführt, um die Gelbildungstemperatur der jeweiligen Zubereitungen festzustellen. Die Messungen fanden in einem Bereich

von 20 bis 5 °C statt, wobei die Temperatur alle 35 Sekunden verringert wurde. Die aus den Oszillationsmessungen hervorgehenden Parameter hängen folgendermaßen zusammen und wurden mittels der geräteeigenen Software bestimmt:

$$G' = G^* \cos \delta$$

Gleichung 3-1

$$G'' = G^* \sin \delta$$

Gleichung 3-2

$$\eta' = G' / \omega$$

Gleichung 3-3

$$\eta'' = G'' / \omega$$

Gleichung 3-4

$$\eta^* = (\eta' \cdot \eta' + \eta'' \cdot \eta'')^{0.5}$$

Gleichung 3-5

$$\tan \delta = G'' / G'$$

Gleichung 3-6

$$T = G^* \cdot \gamma$$

Gleichung 3-7

$\delta$  = Phasenverschiebungswinkel

$G'$  = elastischer Modul

$G''$  = viskoser Modul

$G^*$  = Komplexer Schubmodul

$\eta^*$  = Komplexe Viskosität

$\eta'$  = Realteil der Komplexen Viskosität

$\eta''$  = Imaginärteil der Komplexen Viskosität

$\omega$  = Winkelgeschwindigkeit

$T$  = Schubspannung

$\gamma$  = Deformation



### **3.2.4 Isolierung, Präparation und Aufbewahrung des exzidierten humanen Stratum corneum**

Hautspenden zur Isolierung des Stratum corneum wurden freundlicherweise durch die Chirurgie der Holwede-Klinik Braunschweig zur Verfügung gestellt. Meist handelte es sich dabei um Haut der abdominalen Region von Frauen verschiedenen Alters. Um das Stratum corneum zu erhalten, wurde die jeweils verwendete Hautspende zunächst mittels eines Skalpells grob von ihrem Unterhautfettgewebe befreit. Das so präparierte Hautstück wurde anschließend mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Zur Isolierung des Stratum corneum wurde diese Hautprobe nach einer Methode von Kligman und Christophers [1963] trypsinisiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  konnte das Stratum corneum leicht mit einer Pinzette von den übrigen Hautschichten abgelöst werden. Um fortdauernde enzymatische Zersetzungsprozesse zu unterbinden, wurde es mit einer 0,01 %igen Trypsin-Inhibitorlösung (Typ II-O: Chicken egg white; Sigma, D-Steinheim) und anschließend zweifach mit Wasser gewaschen. Die so erhaltene oberste Schicht der Epidermis wurde auf einem Teflonsieb über Blaugel in einem Exsikkator bei Raumtemperatur getrocknet und aufbewahrt, um es vor Feuchtigkeit zu schützen. Die Hautproben wurden jeweils binnen eines halben Jahres für die diversen Untersuchungen verwendet.

### **3.2.5 Permeationsuntersuchungen**

Wie in Abb. 3.2 dargestellt, wurden für die Permeationsuntersuchungen modifizierte Franz-Zellen in ein auf  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiertes Wasserbad gesetzt. Die Permeationsfläche variierte mit der entsprechenden Zelle zwischen  $0,475$  und  $0,730\text{ cm}^2$ , das Volumen des Akzeptormediums betrug zwischen  $5,20$  und  $6,30\text{ ml}$  und bestand aus  $30,0\text{ mg}$  Natriummonohydrogenphosphat und  $2,50\text{ g}$  Natriumdihydrogenphosphat gelöst zu  $100\text{ ml}$  Wasser pH  $5,0$ . Das Stratum corneum wurde zwischen Donor- und Akzeptormedium auf einem Polycarbonatfilter (Isopore® Membranfilter, Millipore, Irland) platziert. Dieser Filter stellte keinerlei Diffusionsbarriere für den Wirkstoff dar, sondern garantierte eine höhere mechanische Stabilität des Stratum corneum während des Versuches. Der Donor enthielt die jeweilige halb feste oder flüssige Zubereitung

angereichert mit 5-ALA. Die Permeationsstudien wurden über einen Zeitraum von 31 h durchgeführt.

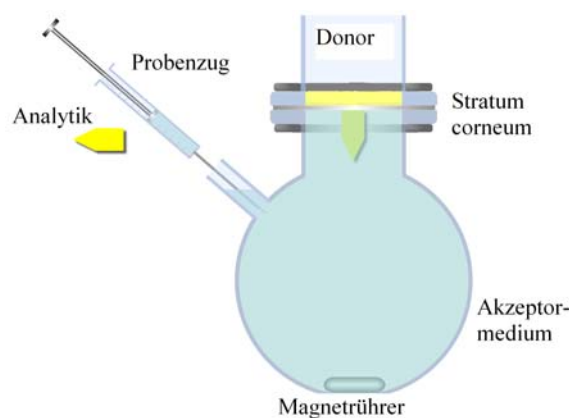


Abb. 3.2: modifizierte Franz-Zelle

### 3.2.6 Dichte-Bestimmung

Die Dichte der halbfesten Zubereitungen wurde mittels eines Luftvergleichspyknometers der Firma Beckmann (D-München) bei Raumtemperatur bestimmt ( $n = 3$ ). Die Einwaagen betrugen zwischen 5 und 10 g. Flüssige Formulierungen wurden mithilfe des elektronischen Dichtemessers DMA 46 der Firma Paar (A-Graz) bestimmt, bei dem die Dichtebestimmung auf eine elektronische Messung der Schwingungsdauer zurückgeführt wird. Pro Messung wurden 1,5 ml der Zubereitung verwendet.

### 3.2.7 pH-Messung

Die Messung des pH-Wertes von Pufferlösungen wurde mit einem pH-Meter pH 539 (Wissenschaftliche Technische Werkstätten, D-Weilheim) durchgeführt ( $n = 3$ ), das mit einer pH-Einstabmesskette 405-60-S7/120 (Mettler Toledo, CH-Uhrdorf) ausgestattet war. Zur pH-Wert-Bestimmung der halbfesten Zubereitungen ( $n = 3$ ) wurden eine Flachmembran-Elektrode InLab® 426 (Mettler Toledo, CH-Uhrdorf) benutzt. Jeder Messung ging eine Kalibration mit Standardpuffern pH 4,66 und pH 9,00 (Merck, D-Darmstadt) bei Raumtemperatur voraus.

### 3.2.8 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das verwendete HPLC-System zur Quantifizierung von 5-ALA bestand aus einer HPLC-Pumpe Spectroflow® 400 solvent delivery system (Kratos Analytical, US-New Jersey) und einem Fluoreszenzdetektor RF 353 Fluorescence HPLC Monitor (Shimadzu, J-Kyoto). Nach erfolgter Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) (s.3.2.9) wurde der Arzneistoff mit einer Wellenlänge von 330 nm zur Fluoreszenz angeregt und seine Emission bei einer Wellenlänge von 418 nm gemessen. Das HPLC-System war weiterhin mit einem Knauer Autosampler MIDAS analytical version (Knauer, D-Berlin) mit einer 20 µl-Probenschleife ausgestattet. Die Reversed Phase-Trennsäule (250 x 4,6 mm) war direkt mit einer Vorsäule (10 x 4,6 mm) verbunden. Beide Säulen (CROM, D-Herrenberg-Kayh) waren mit dem Füllmaterial Hypersil ODS 5 µm gepackt. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die Beckman System Gold Chromatographie Software Version 6.01 (Beckman, D-München) herangezogen.

Die mobile Phase zur Eluierung des Arzneistoffes setzte sich aus einem wässrigen Natriumacetat-Puffer (22 mM) (Merck KGaA, D-Darmstadt) und Methanol (Fisher Scientific GmbH, D-Schwerte) zusammen, die in einem Verhältnis von 3 zu 2 miteinander gemischt wurden. Diese Mischung wurde mit Essigsäure (J.T. Baker, NL-VA Deventer) auf einen pH von 3,38 bei Raumtemperatur eingestellt [Ho et al., 1986, Ho und Guthrie, 1987, Winkler und Müller-Goymann, 2002]. Bei einer Flussrate von 1,3 ml/min wurde 5-ALA mit einer Retentionszeit von 8 Minuten eluiert. Die Proportionalität zwischen Arzneistoffkonzentration und Peakfläche war mit einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 > 0,999$  über einen Konzentrationsbereich von 1,0 bis 500 µg/ml 5-ALA gegeben. Die Nachweisgrenze wurde als 0,517 µg/ml ermittelt, die Bestimmungsgrenze betrug 0,877 µg/ml.

### 3.2.9 Derivatisierung von 5-ALA zur fluorimetrischen Detektion

Um 5-ALA der selektiven fluorimetrischen Detektion zugänglich zu machen, wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) (Fluka, D-Neu-Ulm) gewählt, da beide Substanzen in Anwesenheit des reduzierend wirkenden 2-Mercaptoethanol zu einem fluoreszierenden Produkt reagieren [Roth, 1971] (s. Abb. 3.3). Zur Herstellung des Derivatisierungsreagenzes wurden 27 mg OPA in

500 µl Ethanol LiChrosolv (Merck KGaA, D-Darmstadt) gelöst. Anschließend wurden 4,50 ml Boratpuffer pH 9,5 zugefügt. Dieser wurde aus 0,4 molarer Borsäure (Carl Roth GmbH, D-Karlsruhe) gewonnen, die zuvor mit 0,1 molarer Natronlauge auf einen pH von 9,5 eingestellt wurde. Zur Stabilisierung des Reagenzes wurden 25 µl 2-Mercaptoethanol (Merck KGaA, D-Darmstadt) hinzugefügt. Diese Lösung wurde dann bei Raumtemperatur über Nacht aufbewahrt [Ho et al., 1986, Winkler, 2005]. Unmittelbar vor der Aufnahme des jeweiligen Chromatogrammes wurden 200 µl OPA-Reagens zu der gleichen Menge an Probe gegeben. Ein Aliquot dieser Mischung wurde nach einer Reaktionszeit von exakt 2 Minuten auf die Säule gegeben. Die Reaktion von 5-ALA mit einer Kombination von OPA und 2-Mercaptoethanol vermag innerhalb kürzester Reaktionszeit das fluoreszierende Derivat zu bilden [Hanczko und Molnar-Perl, 2003].

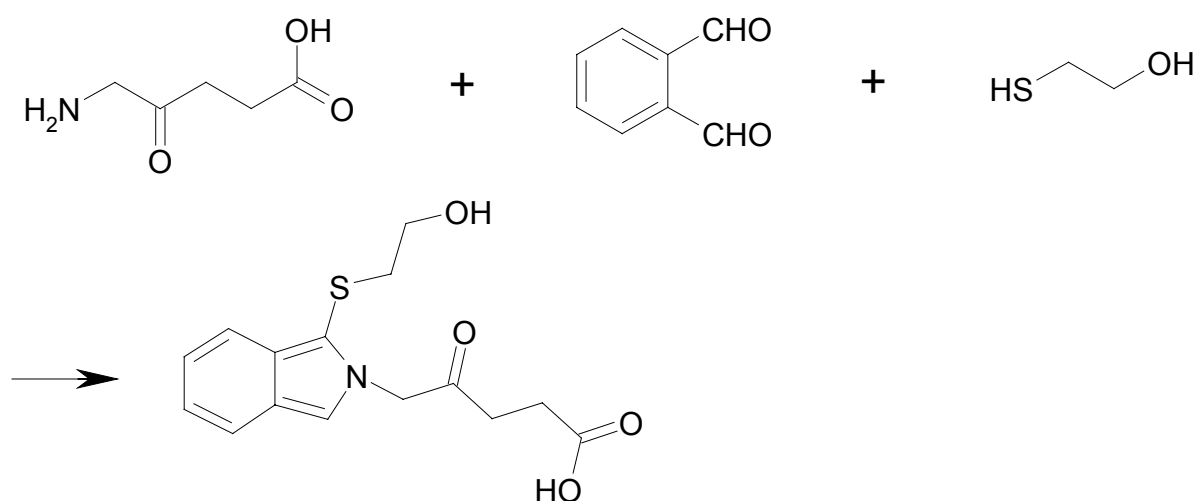


Abb. 3.3: Mögliches Reaktionsschema für 5-ALA mit *o*-Phthaldialdehyd und 2-Mercaptoethanol zum fluoreszierenden Isoindol-Derivat [Donnelly et al., 2006]

### 3.2.10 Thermoanalyse

#### 3.2.10.1 Thermogravimetrie (TG)

Zur Untersuchung des Anteils der flüchtigen Substanzen der Proben wurden diese jeweils in einem offenen Aluminiumtiegel (C3-Analysentechnik, D-Haar) gegen einen leeren Referenztiegel mittels einer TG/DTA 220 mit Diskstation 5200

H (Seiko Instruments, J-Tokyo) vermessen. Ausgehend von einer Temperatur von 25 °C wurden die Proben mit einer Aufheizrate von 5 K/min bis auf 95 °C erhitzt und die thermogravimetrische Kurve aufgezeichnet. Die Einwaagen der Proben betrugen zwischen 14 und 28 mg. Die Kalibrierung der Temperatur erfolgte gegen Indium und Zinn.

### **3.2.10.2 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Die thermoanalytischen Untersuchungen wurden mit einem Differential Scanning Calorimeter DSC 220 C mit einer Diskstation SSC 5200 H durchgeführt. Mit Hilfe der DSC können energetische Vorgänge, die während des Erhitzens oder Abkühlens einer Substanz auftreten, demonstriert werden. Ferner können Änderungen der Enthalpie, sowie die Temperaturen, bei denen diese Vorgänge ablaufen, festgestellt werden [Pharmacopoeia Europaea, 2005]. Das über gesättigter Kaliumchloridlösung auf einen Wassergehalt von 20 % (m/m) hydratisierte Stratum corneum wurde 30 Minuten bei 37 °C in verschiedenen Formulierungen inkubiert. Anschließend wurde die Grundlage mit Filterpapier (Macherey-Nagel, D-Düren) entfernt, das Stratum corneum gefaltet und mit einer Einwaage zwischen 10 und 25 mg in fest verschlossenen Aluminiumtiegel vermessen. Die Proben wurden über einen Temperaturbereich von 20-120 °C bei einer Aufheizungsrate von 5 K/min gegen einen luftgefüllten Referenztiegel vermessen. Die zur Vorbehandlung des Stratum corneum eingesetzten Formulierungen wiesen unter den gewählten Versuchsbedingungen keinerlei Enthalpie-Änderungen auf. Zur Kalibration der Enthalpie und Temperatur wurden Indium und Zinn verwendet.

### **3.2.11 Polarisationsmikroskopie**

Die polarisationsmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Photomikroskop III (Zeiss, D-Oberkochen) durchgeführt. Zur Darstellung wurde eine Digitalkamera Olympus DP 12 (Olympus Deutschland GmbH, D-Hamburg) in Kombination mit der zugehörigen Software Olympus DP 12 Version 3.2 (Soft Imaging System GmbH, D-Münster) genutzt.

### **3.2.12 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die Präparation der Proben erfolgte mittels Gefrierbruchtechnik. Dazu wurden sie in flüssigem Stickstoff bei  $-210\text{ °C}$  zwischen zwei Probhaltern aus Gold schockgefroren. Anschließend wurden sie in den Rezipienten einer Gefrierbruchanlage BAF 400 (Balzers GmbH, D-Wiesbaden) eingeführt und bei  $-100\text{ °C}$  und einem Druck von  $5 \times 10^{-6}$  bar gebrochen. Die aufgebrochene Probe wurde mit einer 2 nm dünnen Platin-Kohle-Schicht unter einem Beschattungswinkel von  $45\text{ °}$  bedampft. Zur mechanischen Stabilisierung des erhaltenen Replikums wurde die Probe mit spektralreiner Kohle in einem Winkel von  $90\text{ °}$  mit einer Schichtdicke von 20 nm bedampft. Die Kontrolle der Schichtdicke erfolgte mit einem Schwingquarz OSG 20 (Balzers GmbH, D-Wiesbaden). Nach Reinigung mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasser wurden die Replika auf Kupfernetze aufgebracht und unter einem Transmissionselektronenmikroskop LEO EM 922 (LEO, D-Oberkochen) mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV betrachtet. Die Bildaufnahmen erfolgten mit einer Proscan HSC 2048 x 2048 Pixel- Digitalkamera (Proscan, D-Lagerlechfeld) unter Verwendung der Esivision Bildanalysesoftware (Olympus Imaging Solutions GmbH, D-Münster).

### **3.2.13 Neutralrot-Test**

Versetzt man lebende Zellen mit dem Farbstoff Neutralrot, diffundiert dieser durch deren Zellmembran und reichert sich in den für die intrazelluläre Verdauung zuständigen Lysosomen an. Nach Extraktion des Farbstoffs kann dieser bei einer Wellenlänge von 540 nm photometrisch vermessen werden. Die zur Messung eingesetzten Zellen waren aus Keratinozyten der HaCaT-Zelllinie. Nach Einsaat in 24er Well Zellkulturplatten (Costar, D-Fernwald) wurden diese im Nährmedium Ready Mix (DMEM High Glucose, PAA, A-Linz) für 48 h kultiviert. Anschließend wurden 0,5 ml der auf ihre Toxizität für die Zellen zu untersuchenden Probelösung zu den Wells gegeben ( $n = 8$ ), die dann 2 h bei  $37\text{ °C}$  inkubiert wurden. Danach erfolgte nach einem Waschvorgang mit calcium- und magnesiumfreiem Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS-Puffer ICN, D-Eschwege) der Austausch des Mediums gegen neutralrothaltiges ( $50\text{ µg/ml}$ ) Nährmedium. Im Verlauf der 3 stündigen Inkubationszeit wurden die noch lebenden Zellen angefärbt. Im Anschluss daran erfolgte das vorsichtige Absaugen des Mediums

und dreimaliges Waschen mit PBS-Puffer. Mit einer Mischung aus 1 %iger Essigsäure und 50 %igem Ethanol wurden die Zellen lysiert, so dass der Farbstoff zugänglich wurde und photometrisch (UV-210 A Spectrophotometer, Shimadzu, J-Kyoto) vermessen werden konnte, wobei eine Proportionalität zwischen der gemessenen Farbstoffkonzentration und der Anzahl der lebenden Zellen zugrunde gelegt wurde. Die nur in Ready-Mix kultivierten Zellen ohne Probelösung dienten als Wert für 100 %ige Viabilität (Positivkontrolle) der Zellen. Als Blindwert (Negativkontrolle) diente reines Ready Mix.

### **3.2.14 UV/VIS-Spektroskopie**

Spektroskopische Messungen im UV-/VIS-Bereich wurden mit einem UV-210 A Spectrophotometer (Shimadzu, J-Kyoto) durchgeführt. Der Geltungsbereich des Lambert-Beerschen Gesetzes wurde dabei stets eingehalten.

### **3.2.15 Röntgenografische Methoden**

#### **3.2.15.1 Röntgenweitwinkeldiffraktometrie (WAXD)**

Die Röntgenweitwinkelmessungen wurden mithilfe einer Debeye-Scherrer-Kamera (Umfang 360 mm) an Thermogel, seinen Variationen, seinen Komponenten oder Stratum corneum durchgeführt, das wie für DSC-Messungen vorbehandelt worden ist (s. 3.2.10.2). Das Stratum corneum wurde in röntgenamorphe Kapillaren (Glas, D-Berlin) mit einem Durchmesser von 0,5 mm eingebracht und über einen Zeitraum von 18 h vermessen. Die Vermessung der reinen halbfesten Grundlagen dauerte 9 h. Zur Erzeugung der Strahlung wurde ein Röntgengenerator PW 1710 (Philips, D-Kassel) mit einer Röntgenröhre PW 2253/11 (Cu K  $\alpha$ ,  $\lambda = 0,154$  nm, Beschleunigungsspannung 40 kV, Anodenstrom 30 mA, Philips, D-Kassel) eingesetzt. Die Interferenzen wurden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes Fuji 100 (Fuji, J-Tokio) sichtbar gemacht. Das Ausmessen der die Interferenzen repräsentierenden Ringe erfolgte unter Verwendung eines herkömmlichen Zirkels mit zwei Metallspitzen, dessen Einstellung auf einen Messschieber übertragen wurde. Die Durchmesser konnten auf diese Weise auf 0,1 mm präzise ermittelt werden. Zur Berechnung der Netzebenenabstände wurde die Braggsche Gleichung (Gleichung 3-8) herangezogen.

Die Untersuchungen von Stratum corneum behandelt mit Probiol® erfolgte mittels eines Goniometers Typ PW 3050/60 MPD-System, das sich aus einem Röntngengenerator PW 3040/60 X'Pert Pro, Fabrikat DY2171 mit einer Röntgenröhre PW3373/00 DK147726 Cu LFF der Firma PANalytical (NL-Almelo) zusammensetzte. Der Probenträger war aus Edelstahl PW1811/00 gefertigt, das rotierende Probengestell bestand aus einem Spinner PW3064. Die Datenaufnahme erfolgte mit der X'Pert Data Collector-Software, während die Datenauswertung mit X'Pert High Score erfolgte.

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta$$

Gleichung 3-8

$\lambda$  = Wellenlänge der Röntgenstrahlung

$n$  = Ordnung der Interferenz

$d$  = Netzebenenabstand

$\theta$  = Glanzwinkel

### **3.2.15.2 Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie (SAXD)**

Die unter 3.2.15.1 untersuchten Proben wurden ebenfalls per Röntgenkleinwinkeldiffraktometrie untersucht. Dazu wurde die Probe zwischen zwei röntgenamorphe Kapton-Folien (Krempel, D-Vaihingen) in einen würfelförmigen Probenhalter gelegt. Dieser wurde in eine Kiessig-Lochblendkamera (Institutseigenbau) platziert. Die Röntgenstrahlung erzeugte ein Röntngengenerator PW 1710 (Philips, D-Kassel) mit einer Feinfokus-Röntgenröhre PW 2213-25 (Philips, D-Kassel) mit Cu-Anode (Beschleunigungsspannung 40 kV, Anodenstrom 25 mA). Die Beugungsbilder wurden mit einem OED-50M mit ASA-SAX-Karte (MBraun, D-Garching) aufgenommen, während die Datenverarbeitung mithilfe der Software ASA (MBraun, D-Garching) erfolgte. Die Ermittlung der Netzebenenabstände erfolgte wieder über Gleichung 3-8.



## **4 Versuchsergebnisse und Diskussion**

### **4.1 Entwicklung der Thermogel-Komposition**

#### **4.1.1 Vorlagen für die Entwicklung der optimierten halbfesten Formulierung**

In Anlehnung an die Arbeit von Winkler [2005] sollte durch sukzessives Screenen ein halbfestes poloxamerhaltiges Gel mit dem Ziel der Permeationsförderung für 5-ALA entwickelt werden. Winkler erkannte das permeationsfördernde Potential eines kommerziell erhältlichen flüssigkristallinen Ringing-Gels auf Poloxamerbasis zur dermalen Anwendung mit Namen Dolgit® Mikrogel, das lokal gegen Entzündungen und Schmerzen eingesetzt wird. Dieses Fertigarzneimittel enthält als Arzneistoff Ibuprofen und verbesserte die Permeation von 5-ALA und seinem Butylester um den Faktor 3,24 bzw. 43,3 im Vergleich zu Basiscreme DAC. Bei dem Versuch, dieses Fertigarzneimittel ohne den antiinflammatorischen Arzneistoff nachzubauen, gelangen Winkler jedoch nur flüssige Zubereitungen. Der Flux des 5-ALA-Butylesters durch Stratum corneum aus der effektivsten Formulierung war mit  $4,19 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$  zwar um den Faktor 11 größer als der Flux aus Basiscreme DAC ( $3,72 \cdot 10^{-10} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ ), jedoch um den Faktor 4,3 geringer als aus Dolgit® Mikrogel ( $1,79 \cdot 10^{-8} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ ) [Winkler und Müller-Goymann, 2005]. Die flüssige Konsistenz wurde in Hinblick auf die dermale Applikation ebenfalls als nicht optimal empfunden. Der Ansatz der vorliegenden Arbeit liegt also darin, die Komponenten des Fertigarzneimittels ohne den Arzneistoff so zu variieren, dass ein halbfestes Poloxamergel mit optimierter 5-ALA-Permeation resultiert. Die Permeationseigenschaften sollen mit denen gewöhnlicher Arzneibuchgrundlagen wie Basiscreme DAC und Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe verglichen werden.

#### 4.1.2 Zusammensetzung des Thermogels

Wie unter 3.2.1.3 beschrieben, wurden im Zuge der systematischen Suche nach einer Poloxamer basierten halbfesten Grundlage variierende Mengen der Komponenten Poloxamer, Isopropylalkohol, Dimethylisosorbid, mittelkettige Triglyzeride und Wasser gemischt. Abb. 4.1 verdeutlicht, dass das Thermogel mit seinen Eigenschaften wie halbfeste Konsistenz, Isotropie unter dem Polarisationsmikroskop oder hörbare Resonanzeffekte nur in einem gewissen Kompositionsbereich existiert. Schon geringe Abweichungen in der Zusammensetzung verändern die Eigenschaften des Systems dahin gehend, dass es entweder seinen Ringing-Effekt verliert, oder dass aus dem flüssigkristallinen Zustand eine Emulsion wird. Da das Thermogel eines der ersten Systeme war, das mit halbfester Konsistenz empirisch ermittelt wurde, ist es sogleich für Permeationsuntersuchungen eingesetzt worden. Das Phasendiagramm wurde weiter erarbeitet, um die Verlaufsgrenzen der einzelnen Systeme festzulegen. Inwieweit die anderen isotrop erscheinenden Zubereitungen mit Ringing-Effekt (s. Abb. 4.1) eine 5-ALA-Permeation fördern, könnte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Das folgende pseudoternäre Phasendiagramm verschafft einen Überblick über die entstandenen Formulierungen und ihre Phasenlage (Abb. 4.1). Tabelle 4.1 beinhaltet die Zusammensetzung des für die weiteren Untersuchungen ausgewählten, bei Raumtemperatur halbfesten Systems namens Thermogel.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des Thermogels

Komponente	Massenanteil [g/100g]
Poloxamer	20,0
Dimethylisosorbid	12,5
Isopropylalkohol	12,5
Mittelkettige Triglyzeride	5,0
Wasser	50,0

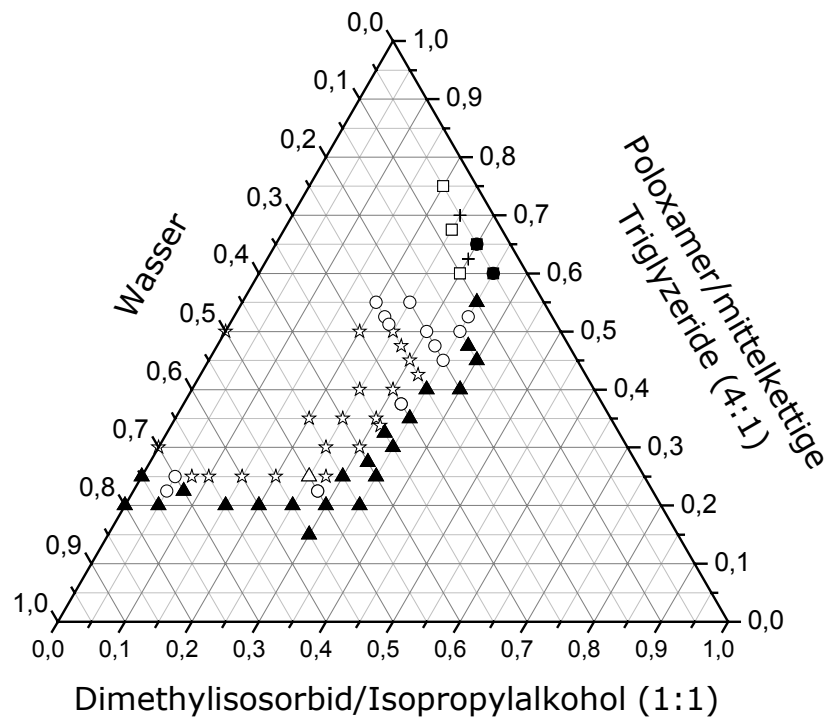


Abb. 4.1: Pseudoternäres Phasendiagramm mit Angabe der Konsistenz und des polarisationsmikroskopischen Erscheinungsbildes bei Raumtemperatur, unmittelbar nach der Herstellung: halbfest mit Ringing-Effekt, isotrop, (-☆-), für Thermogel (-△-); flüssig, Emulsion (-▲-); halbfest, isotrop (-○-); flüssig, hexagonal-flüssigkristalline Textur (-+-); hochviskos, isotrop (-■-); hochviskos, hexagonal-flüssigkristalline Textur (-□-)

## 4.2 Rheologie

Die Rheologie wurde als Screening-Methode für die Charakterisierung der optimierten Rezeptur ausgewählt. Sie eignet sich zur Charakterisierung des Fließverhaltens von halbfesten Zubereitungen. Viskosimetrische Untersuchungen wie die Bestimmung der Fließgrenze geben Auskunft über die Konsistenz und die Gerüstfestigkeit einer Formulierung. Oszillationsrheologische Messungen erlauben vielfältigere Aussagen über die strukturellen Eigenschaften einer Zubereitung,

was z.B. von immenser Wichtigkeit hinsichtlich der Freigabe von Arzneistoffen aus der Grundlage ist. Ferner können Aussagen über die Lagerstabilität der Formulierungen getätigt werden.

#### **4.2.1 Viskosimetrische Bestimmung der Fließgrenzen**

Zu den gebräuchlichsten viskosimetrischen Untersuchungen gehört die Bestimmung der Fließgrenze einer halbfesten Zubereitung. Die folgenden Abbildungen zeigen, dass bei jeder Zubereitung mit zunehmender Schubspannung die Momentane Viskosität bis zu einem Maximalwert ansteigt und dann plötzlich abfällt. Dieser Wert wird als Fließgrenze definiert. Gleichzeitig nimmt ab dem Erreichen der Fließgrenze die Scherrate beträchtlich zu. Die Fließkurven von Basiscreme (Abb. 4.2) und WHS (Abb. 4.3) verdeutlichen am anschaulichsten, dass es mit dem Erreichen der Fließgrenze bei jeweils 22,5 Pa zum Strukturzusammenbruch der Formulierung kommt, da die drastische Abnahme der Momentanen Viskosität und das Ansteigen der Scherrate korrelieren. Durch die Wahl der einheitlichen Skalierung für die Graphen der Basiscreme und der WHS wird trotz der Ermittlung des gleichen Wertes für die Fließgrenze der Unterschied der Fließkurven deutlich. Betrachtet man z.B. die Scherrate beider Systeme bei einer Schubspannung von 100 Pa, resultiert für die Basiscreme ein Wert von ca.  $3 \text{ s}^{-1}$ , während der Wert für WHS bei ca.  $20 \text{ s}^{-1}$  liegt. Für Dolgit® Mikrogel und Thermogel wurde die Skalierung ebenfalls gleich gewählt, da in ihren Fließkurven eher Ähnlichkeiten auftreten als im Vergleich mit denen der Arzneibuchgrundlagen. Die Software ermittelt eine Fließgrenze für Dolgit® Mikrogel von 47,5 Pa (Abb. 4.4), und das Thermogel begann ab einer Schubspannung von 77,5 Pa an zu fließen (Abb. 4.5). Die Fließgrenzen liegen deutlich höher als die der Arzneibuchgrundlagen. Die Systeme sind also stärker belastbar, bis sie zu fließen beginnen und ihre Struktur abgebaut wird. Das zeigt sich auch darin, dass die Scherraten der flüssigkristallinen Systeme viel geringer sind. Beispielsweise wird bei 200 Pa, einer Schubspannung, die jenseits der Fließgrenze aller vier Systeme liegt, WHS mit einer Scherrate von ca.  $157 \text{ s}^{-1}$  deformiert, während die Scherrate für Basiscreme bei  $8,86 \text{ s}^{-1}$  liegt. Dolgit® Mikrogel wird mit einer Scherrate von  $0,18 \text{ s}^{-1}$  50mal weniger deformiert als die Basiscreme, und Thermogel reagiert auf die vorgegebene Schubspannung mit einer Scherrate von  $0,03 \text{ s}^{-1}$ . Es ist offensichtlich, dass das Thermogel der

vorgegebenen Beanspruchung am längsten standhält, bevor es zu fließen beginnt. Kurz vor Erreichen der Fließgrenze verfügt das Fertigarzneimittel über einen um den Faktor 2,08 höheren Wert für die Momentane Viskosität im Vergleich zum Thermogel, der sehr schnell danach abfällt. Im Falle des Thermogels ist die Fließgrenze nicht so scharf abgrenzbar wie bei den anderen Systemen, und auch nach Erreichen der Fließgrenze nimmt die Momentane Viskosität im Vergleich zu den anderen Zubereitungen relativ langsam ab. Im Anfangsbereich der Messung kommt es zu einem langsamen Anstieg der Momentanen Viskosität bis zum Maximalwert zur Festlegung der Fließgrenze, der dann langsam abfällt. Dies deutet auf eine leichte Strukturverfestigung bis zu einem kritischen Punkt hin, ab dem der Strukturabbau einsetzt. Dieses Phänomen wurde mit Oszillationsmessungen weiter untersucht (s. 4.2.3.3).

Schon nach dieser simplen rheologischen Untersuchung zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem flüssigkristallinen Fertigarzneimittel und dem neu entwickelten Thermogel. Da das Thermogel makroskopisch schon die gewünschte halbfeste Konsistenz besitzt, wurde es nicht weiter verändert, um die rheologischen Eigenschaften dem Fertigarzneimittel anzunähern, sondern es wurde mit oszillationsrheologischen Untersuchungen unter Erhalt seiner strukturellen Integrität eingehender charakterisiert.

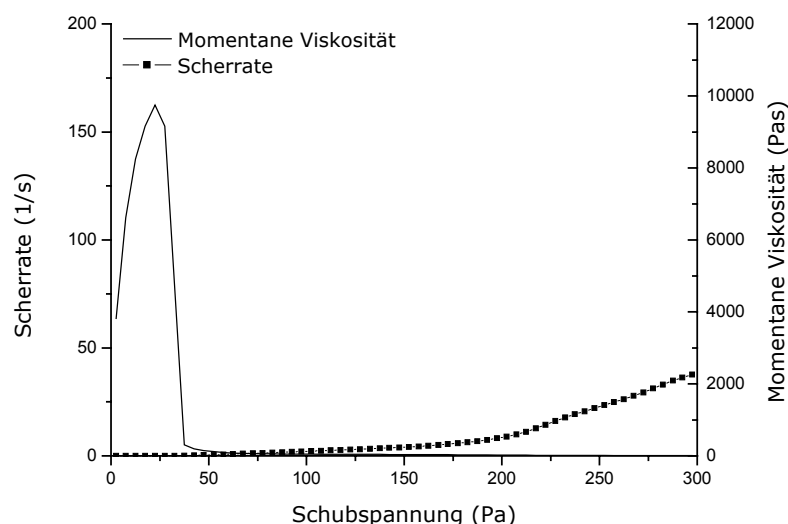
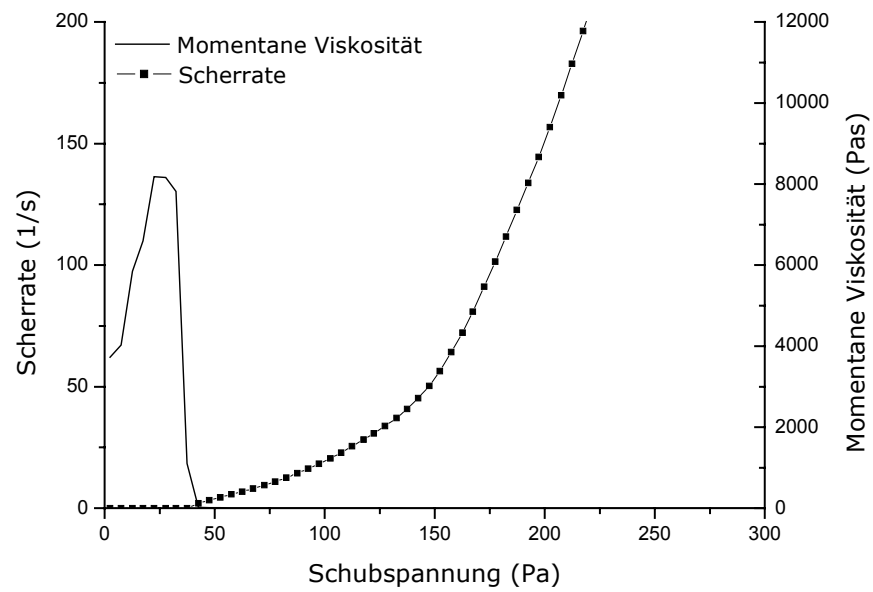
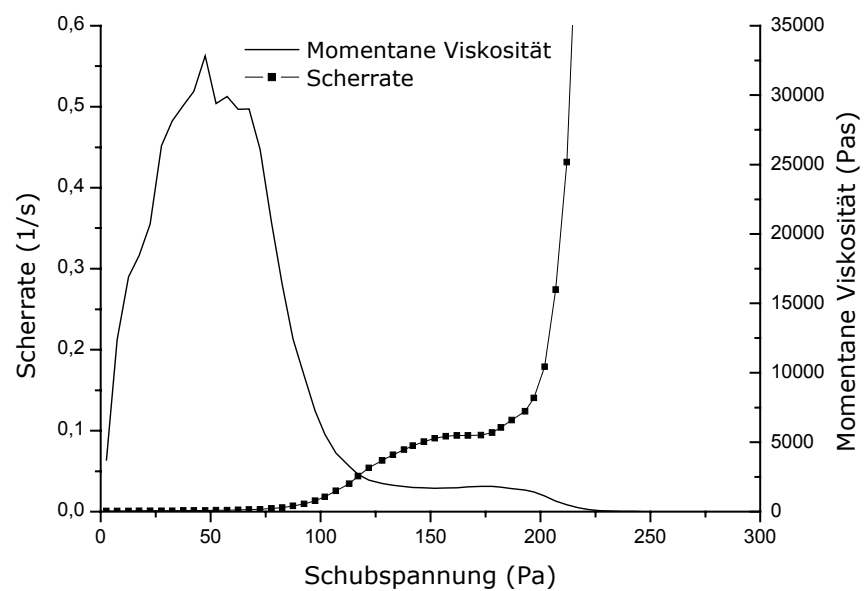
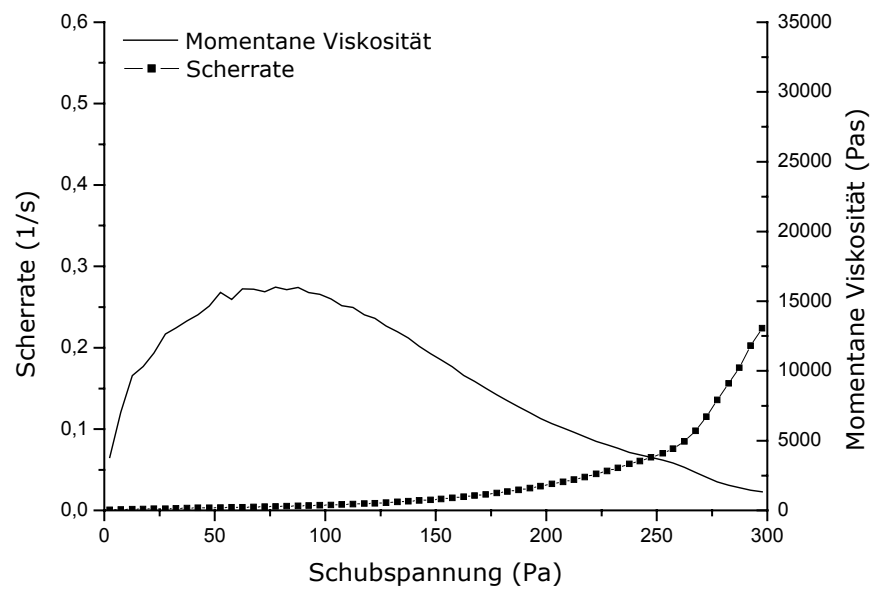


Abb. 4.2: Fließkurve von Basiscreme,  $n = 2$

Abb. 4.3: Fließkurve von WHS,  $n = 2$ Abb. 4.4: Fließkurve von Dolgit® Mikrogel,  $n = 2$

Abb. 4.5: Fließkurve von Thermogel,  $n = 2$

#### **4.2.2 Charakterisierung des Fließverhaltens eingesetzter Modellgrundlagen**

Das Rheogramm der WHS zeigt den typischen Kurvenverlauf für Cremes und Gele (Abb. 4.6). Unterzieht man die Probe einer zunehmenden Scherbeanspruchung bis zu einem Maximalwert und nimmt diese Beanspruchung dann in gleichem Maße wieder zurück, ergibt sich das charakteristische Rheogramm eines plastisch fließenden Körpers mit Casson-Charakteristik, bei dem die Fließfähigkeit nach Erreichen der Fließgrenze über einen längeren Bereich fortlaufend zunimmt, bis sie einen konstanten Wert erreicht [Bauer et al., 1999]. Dies Verhalten weist auf den Abbau einer Gerüststruktur hin. Folglich sind die Anstiegs- und Abstiegskurve nicht deckungsgleich und schließen eine Hysteresisfläche ein. Die Größe dieser Fläche hängt außerdem in hohem Maße von der Geschwindigkeit, mit der der Schervorgang durchlaufen wird, ab [Rose, 1999]. Daher wurde auf eine Integration der Hysteresisflächen verzichtet, wenn auch alle Proben unter gleichen Messbedingungen untersucht wurden. Die Auftragung im gleichen Maßstab für alle Zubereitungen macht deutlich (Abb. 4.6), dass eine Hysteresisfläche bei der Basiscreme nicht bzw. kaum nachweisbar ist, was auf ein schnelles „Ausheilen“ der zerstörten Gerüststrukturen hinweist. Generell kann festgehalten werden, dass der Wiederaufbau einer Struktur umso langsamer erfolgt, je größer die Hysteresisfläche erscheint. Dieses Phänomen der zeitlichen Verzögerung im Wiederaufbau eines plastischen Körpers nach erfolgter Scherbeanspruchung wird als Thixotropie bezeichnet. Zwar ist für Basiscreme ein mit WHS vergleichbarer Kurvenverlauf zu erwarten, da auch dort ein Gerüst abgebaut werden muss. Bei der Basiscreme stellt sich allerdings sehr schnell nach Erreichen der Fließgrenze eine konstante Fließfähigkeit ein, was charakteristisch für einen Bingham-Körper ist (s. Abb. 4.6). Es ist erkennbar, dass die Basiscreme über die vergleichsweise größte strukturelle Integrität verfügt, da sie auf die jeweils vorgegebene Schubspannung mit der weitaus geringsten Scherrate reagiert. Nach Erreichen der Fließgrenze ist WHS von allen untersuchten Grundlagen am stärksten deformierbar, da sie eine Höchst-Scherrate von ca.  $80 \text{ s}^{-1}$  bei maximal vorgegebener Schubspannung aufweist. Basiscreme zeigt eine maximale Scherrate von ca.  $3,7 \text{ s}^{-1}$ , während sich für Dolgit® Mikrogel eine maximale Scherrate von  $23 \text{ s}^{-1}$  ergibt.



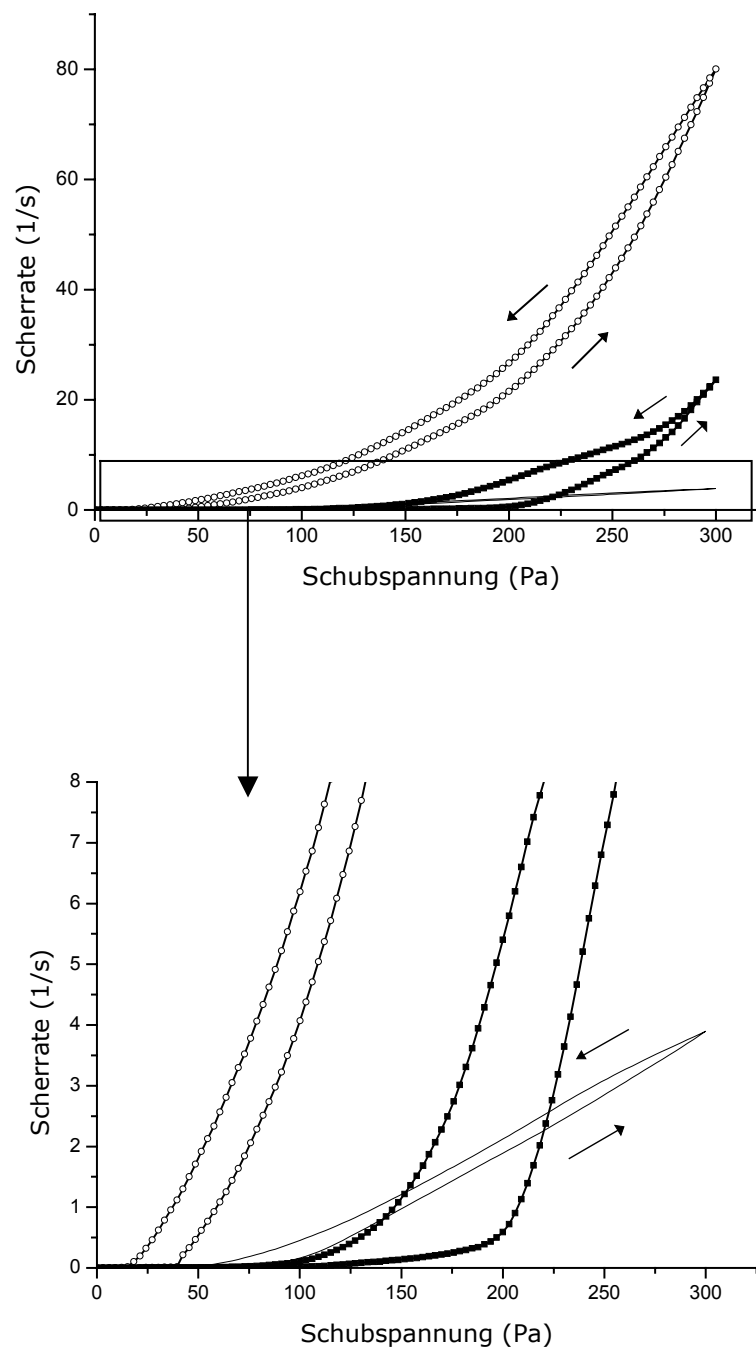


Abb. 4.6: Rheogramm von WHS (-○-,  $n = 2$ ), Dolgit® Mikrogel (-■-,  $n = 4$ ), Basiscreme (-■-,  $n = 2$ ); unten: vergrößerter Ausschnitt

### **4.2.3 Oszillationsrheologische Charakterisierung des Thermogels**

Nachdem die unter 4.1 vorgestellte halbfeste Zubereitung in Anlehnung an das Fertigarzneimittel formuliert wurde, wurde sie rheologisch mit dem Vorbild Dolgit® Mikrogel und den Arzneibuchgrundlagen verglichen. Um das Verhalten viskoelastischer Stoffe zu untersuchen, die sowohl Eigenschaften fester als auch flüssiger Stoffe besitzen, wird ein Körper im Zuge einer oszillationsrheologischen Untersuchung einer harmonisch oszillierenden Deformation unterzogen. Hierbei können mit dem elastischen und viskosen Modul gleichzeitig zwei Parameter einer Probe untersucht werden, was eine umfassendere Aussage über ein System erlaubt als z.B. die Fließgrenzenbestimmung einer viskosimetrischen Messung. Die Fließgrenze stellt keine Stoffkonstante dar; sie hängt von der zeitlichen Vorbehandlung der Probe und den Messbedingungen ab. Besser wird der Zeiteinfluss bei der Oszillation berücksichtigt, da durch die Vorgabe der Frequenz prinzipiell eine Zeitabhängigkeit gegeben ist. Wenn die Probenstruktur während des Versuches intakt bleibt, die Grenze des linear-viskoelastischen Bereiches also nicht überschritten wird, verlaufen Schubspannungskurve und Deformationskurve gleichzeitig in Form von Sinus-Kurven. Bei rein elastischem Verhalten gibt es keine Phasenverschiebung zwischen beiden Kurven, d.h. der Phasenverschiebungswinkel  $\delta$  hat einen Betrag von  $0^\circ$  [Physica® Messtechnik GmbH, 1991]. Das bedeutet, dass nach Beendigung der Beanspruchung die Energie wieder zur Verfügung steht. Idealviskose Substanzen reagieren mit einem Phasenverschiebungswinkel zwischen beiden Kurven von  $90^\circ$ . Die eingetragene Energie wird somit nicht zurückgewonnen.  $G'$  stellt ein Maß für den gespeicherten Energieinhalt der Probe dar und wird auch als Realteil des Komplexen Schubmoduls  $G^*$  oder als Speichermodul bezeichnet.  $G''$  repräsentiert den Imaginärteil von  $G^*$ , wird auch als Verlustmodul bezeichnet und steht für die Energie, die bei der Beanspruchung verloren geht [Physica® Messtechnik GmbH, 1991].

#### 4.2.3.1 Bestimmung des viskoelastischen Bereichs

Zur Bestimmung des linear viskoelastischen Bereiches wurde zunächst mit einem Amplitudensweep die Schubspannung ( $\tau$ ) bei konstanter Winkelgeschwindigkeit ( $\omega$ ) kontinuierlich erhöht, wobei der Speichermodul  $G'$  gegen die Schubspannung aufgezeichnet wurde. Als Winkelgeschwindigkeit wurde 0,5 Hz gewählt, was als üblicher Wert für vergleichbare Systeme gilt und sich im anschließenden Frequenzsweep als geeignet erwies. Abb. 4.7 verdeutlicht, dass der viskoelastische Bereich endet, sobald  $G'$  bei weiterem Ansteigen der Schubspannung abfällt. Das ist in diesem Falle ab ca. 100 Pa der Fall. Es kommt also zum Strukturzusammenbruch. Für die weiteren Messungen wurde folglich eine Schubspannung von 55 Pa gewählt, um die strukturelle Integrität der Zubereitung zu gewährleisten. Anschließend wurde ein Frequenzsweep durchgeführt. Die zuvor gewählte Schubspannung wurde dafür bei 55 Pa konstant gehalten, während die Oszillationsfrequenz in Abhängigkeit der Zeit erhöht wurde. Die Auftragung von  $G'$  gegen die Winkelgeschwindigkeit ermöglichte die Ablesung der Messfrequenz, bis zu der  $G'$  keinen Abfall zeigt (Abb. 4.8).

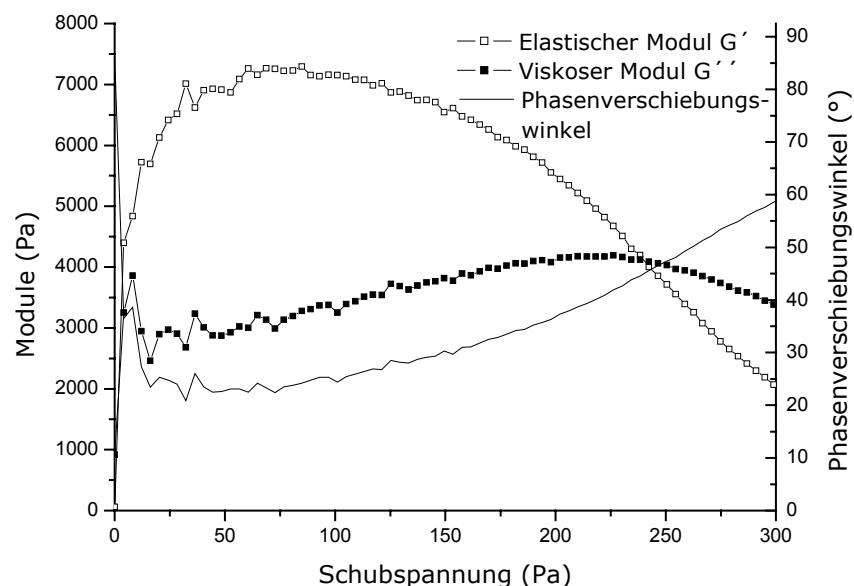


Abb. 4.7: Amplitudensweep von Thermogel;  $\omega = 0,5$  Hz

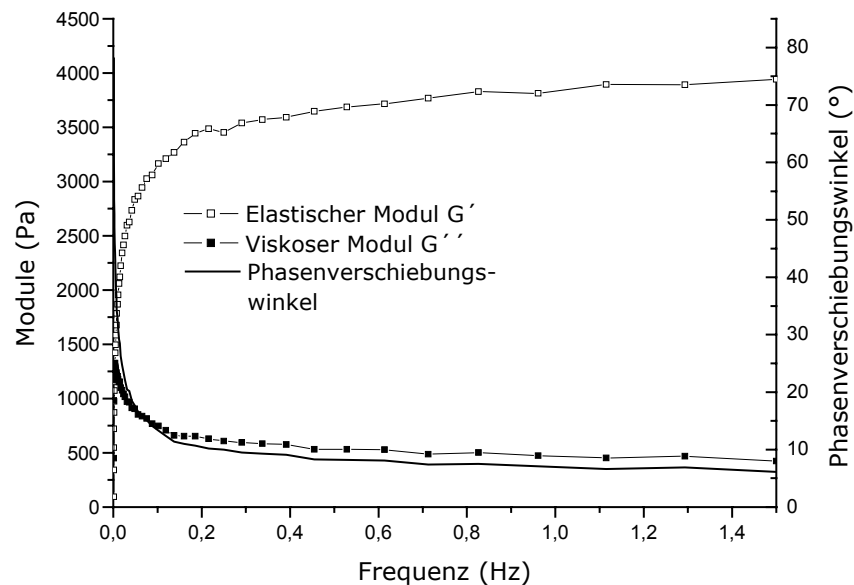


Abb. 4.8: Frequenzsweep von Thermogel;  $\tau = 55$  Pa

#### 4.2.3.2 Bestimmung des Gel-Punktes von Thermogel

Anhand eines Temperatursweeps kann der Gelierpunkt eines Gels festgestellt werden. Bei konstant gewählter Schubspannung und Frequenz, die als optimale Messparameter aus Amplituden- und Frequenzsweep hervorgehen, wird die Temperatur kontinuierlich erhöht. Gelierprozesse können recht präzise mit einem charakteristischen Verhältnis von elastischem ( $G'$ ) zu viskosem Modul ( $G''$ ) beschrieben werden. Bezeichnend für idealviskose Stoffe ist ein Phasenverschiebungswinkel von  $90^\circ$ , während er bei idealelastischen bei  $0^\circ$  liegt. Ferner dominiert  $G'$  über  $G''$ , wenn es sich um einen vorwiegend elastischen Stoff handelt. Klassischer Weise wird der Bereich, in dem  $G''$  größer als  $G'$  ist, als Sol-Zustand bezeichnet, während der Gel-Zustand erreicht ist, wenn  $G'$  größer als  $G''$  ist [Mezger, 2000]. Der Schnittpunkt dieser beiden Graphen wird als Sol/Gel-Übergang oder Gel-Punkt bezeichnet. Abb. 4.9 zeigt, dass ab einer Temperatur von ca.  $10^\circ\text{C}$  die Werte für beide Module leicht anzusteigen beginnen. Bei  $12,7^\circ\text{C}$  wird der Gel-Punkt erreicht, da dort  $G'$  und  $G''$  gleich groß sind. Mit zunehmender Temperatur steigen die Werte für  $G'$  weiter an und

dominieren über  $G''$ , was ein Hinweis auf die intensive Ausprägung des Gelgerüsts ist. Der Phasenverschiebungswinkel beginnt hingegen schon bei Temperaturen abzufallen, bevor der Gel-Punkt erreicht ist und die Zubereitung noch als Flüssigkeit vorliegt. Kurz unter  $10\text{ °C}$  verringert sich der Phasenverschiebungswinkel deutlich, während  $G'$  und  $G''$  noch kaum Veränderungen zeigen. Das deutet darauf hin, dass sich die viskoelastischen Eigenschaften des Sols zu verändern beginnen, und es zur Bildung von Assoziaten kommt, die sich erst später intensiv vernetzen. Die elastischen Eigenschaften des Sols werden mit steigender Temperatur immer größer, und bei  $12,7\text{ °C}$  sind die Assoziate zahlreich genug, um sich untereinander zu vernetzen und das Gelgerüst bilden zu können. Dies untermauert ein Phasenverschiebungswinkel von  $\delta = 45^\circ$  bei dieser Temperatur. Sein weiteres Abfallen auf Werte um  $20^\circ$  macht deutlich, dass nun ein System vorliegt, dass überwiegend elastischen Charakter hat.

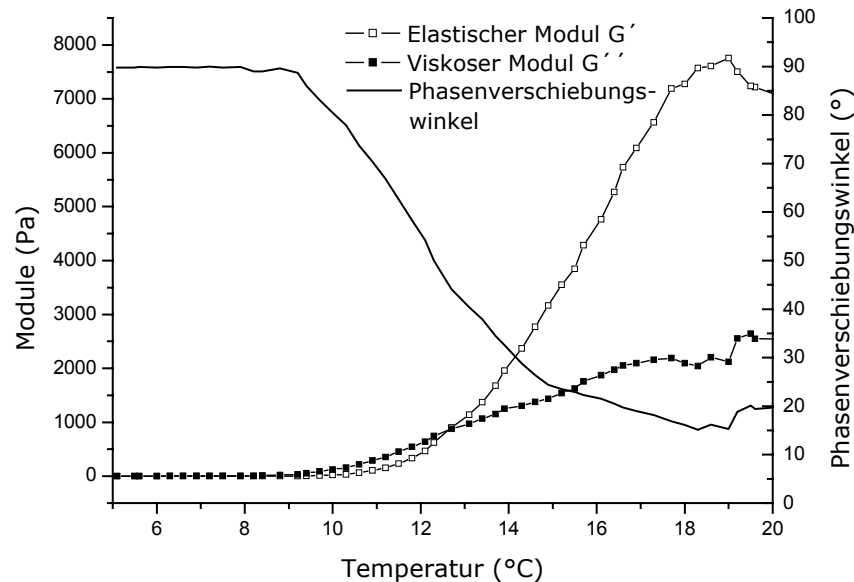


Abb. 4.9: Temperatursweep von Thermogel

Dieses untypische Verhalten, in der Kälte als Sol und in der Wärme als Gel vorzuliegen, wird auf die Beschaffenheit des Polymers zurückgeführt.

Herkömmliche Hydrogele wie Carboxymethylcellulose- oder Polymethacrylatgele können durch Erwärmung verflüssigt werden, um bei Abkühlung wieder in den Gelzustand überzugehen [Bauer et al., 1999]. Die Thermogelierung bietet die Möglichkeit, z.B. Arzneistoffe in der Kälte zunächst schonend zu lösen, und sie dann mit dem Vehikel dermal zu applizieren, da letzteres bei Körperkontakt zu gelieren beginnt, wobei es zur Anheftung an die Haut kommt. In der Literatur wird die thermale Gelierung für Polymerlösungen des Poloxamer 407 mit einer Mindestkonzentration von 20 % beschrieben [Cabana et al., 1997]. Bei tiefen Temperaturen liegen die Poloxamermoleküle als Monomere vor. Im Zuge einer Erwärmung entsteht zunächst ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Mizellen, bis es schließlich zur Bildung von vernetzten Aggregaten kommt. Die kugelförmigen Mizellen bestehen aus einem Polyoxypropylen (POP)-Kern mit einem Polyoxyethylen (POE)-Mantel. Dies ist damit zu erklären, dass die POP-Einheit weniger gut wasserlöslich, die POE-Einheit hingegen gut wasserlöslich ist. Generell sind Poloxamere besser in kaltem als in warmem Wasser löslich, was auf die umfangreichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wassermolekülen und den Ethersauerstoffatomen des Polymers zurückführbar ist. Die Abnahme der Löslichkeit des Polymers mit steigender Temperatur hängt mit steigender Dehydratisierung der Ethergruppen des Poloxamers zusammen. Die temperaturempfindlichen Wasserstoffbrückenbindungen brechen mit ansteigender Temperatur auf, und die Polymerketten können nun effektiver in Wechselwirkung miteinander treten, wodurch es zur Gelierung kommt [Bohorquez et al., 1999, Miller und Drabik, 1984]. Cabana et al. [1997] vermuten Mizellpackung und Verknäuelungen von Mizellen als treibende Kraft der Gelbildung. Ab einer gewissen Konzentration ist es den Mizellen nicht mehr möglich, sich individuell zu bewegen, und sie gelangen in Kontakt, wodurch die Starre des gebildeten Gels erklärt wird. Alexandridis et al. [1994] zeigten ebenfalls, dass die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) temperaturabhängig ist.

#### 4.2.3.3 Charakterisierung des Fließverhaltens von Thermogel

Wie unter 3.2.1.3 beschrieben, wurde das Thermogel 1,5 Min. mit 1450 Umdrehungen pro Minute mit dem Unguator hergestellt, und die Rheogramme wurden zunächst unmittelbar nach der Herstellung am gleichen Tag aufgenommen. Die präzise Charakterisierung des Systems ist anhand der Beobachtung des Verlaufes der oszillationsrheologischen Parameter wie  $G'$ ,  $G''$  und  $\delta$  möglich. Während im Zuge der Aufnahme klassischer Rheogramme eine Fließgrenzenbestimmung durchgeführt wird, ist dies im Oszillationsmodus nicht sinnvoll, da dort unter Strukturerguss gemessen wird. Es soll keine plastische Verformung stattfinden. Aus diesem Grunde wird bei sehr geringen Deformationen gemessen. Während bei Rotationsversuchen die Scherrate mit der Dimension  $1/s$  angegeben wird, ist die Deformation dimensionslos, da die Auslenkung der Probe im Verhältnis zum Plattenabstand gemessen wird. Bei zerstörungsfreier Beanspruchung der Probe werden die viskoelastischen Eigenschaften eines Systems aufgezeichnet. Die Aussagen, die hierbei über ein System getätigt werden können, sind viel umfassender als nur die Bestimmung der Fließgrenze im Rotationstest, die nur einen Wert darstellt, der oftmals nur schwer reproduziert werden kann.

Abb. 4.10 zeigt den Verlauf der oszillationsrheologischen Parameter  $G'$  und  $G''$  von Thermogel unmittelbar nach der Herstellung bei Variation der Schubspannung. Letztere wurde zunächst kontinuierlich erhöht und ab einem Maximalwert von 300 Pa wieder zurückgenommen. Es ist deutlich erkennbar, dass Aufwärts- und Abwärtskurve des elastischen Moduls nicht deckungsgleich verlaufen. Bei Zurücknahme der Beanspruchung sind die Werte für  $G'$  deutlich höher als die Messwerte bei Zunahme der Schubspannung, was auf eine Strukturverfestigung hindeutet. Der viskose Anteil des Systems veränderte sich hingegen kaum. Abb. 4.11 zeigt die Ergebnisse der Vermessung des Systems nach 1 Tag Lagerzeit. Aufwärts- und Abwärtsdiagramm des elastischen Moduls liegen nun nahezu übereinander, während der viskose Anteil des Systems mit dem unmittelbar nach der Herstellung vermessenen übereinstimmt.

Da in den folgenden Kapiteln Thermogel untersucht werden soll, das verschiedene Konzentrationen verschiedener Salze enthält, würde die Darstellung aller oszillationsrheologischen Parameter der Systeme zu umfangreich sein. Aus

Gründen der besseren Übersichtlichkeit der Grafiken wurde die Deformation als Antwort auf die zugehörige und vorgegebene Schubspannung ausgewählt, obwohl umfassendere Aussagen anhand von  $G'$  und  $G''$  hätten gemacht werden können. Abb. 4.12 und Abb. 4.13 zeigen die für Thermogel resultierende Deformation, die im Oszillationsmodus bei variierender Schubspannung während der gleichen Messungen ermittelt wurde, für die  $G'$  und  $G''$  in Abb. 4.10 und Abb. 4.11 dargestellt werden. Es wird deutlich, dass die verschiedenen Darstellungen die gleichen Rückschlüsse auf das System ermöglichen, was seine Vermessung unmittelbar nach der Herstellung und nach einem Tag Lagerungszeit betrifft. Während Abb. 4.10 und 4.11 verdeutlichen, dass vor allem  $G'$  sich stark verändert und  $G''$  kaum variiert, wenn das Thermogel direkt nach der Herstellung oder nach 1 Tag Lagerzeit vermessen wird, zeigen die Abb. 4.12 und 4.13 das unterschiedliche Deformationsverhalten. Unmittelbar nach der Herstellung vermessen, zeigt das System eine während der Aufwärtskurve leicht zunehmende Deformation bei ansteigender Schubspannung (Abb. 4.12), was gleichbedeutend mit einem gewissen Gerüstabbau ist. Mit Zurücknahme der Belastung verbleibt das System jedoch in einem verfestigten Zustand, denn das Ausmaß der Deformation bleibt während der Abwärtskurve stets unter den Werten des Aufwärtsdiagrammes. Diese Rheopexie konnte nicht beobachtet werden, wenn das Thermogel vor der Messung 1 Tag ruhen gelassen wurde. In diesem Falle zeigte das System nahezu Deckungsgleichheit der Aufwärts- und Abwärtskurve (Abb. 4.13). Ferner ist auffällig, dass das gelagerte Thermogel nur bis zu einem Wert von ca. 0,04 deformiert werden kann, während das unmittelbar nach Herstellung vermessene Thermogel um den Faktor 2,75 stärker deformiert wurde und auf die maximale Schubspannung von 300 Pa mit einer Deformation von 0,11 reagierte. Das Gerüst des gelagerten Thermogels ist also deutlich stärker ausgebildet und schwerer zu deformieren. Dieses Phänomen zeigt eindeutig, dass die endgültige Gelstruktur des Thermogels erst nach einer gewissen Lagerzeit ausgebildet ist. Moderate Scherung scheint diesen Vorgang zu begünstigen, wobei die Poloxamerketten möglicherweise aneinander vorbeigleiten und vermehrt in Kontakt treten, wodurch sie über Wasserstoffbrücken Bindungen zu anderen Ketten ausbilden. Brämer [2004] erkannte, dass die meisten halbfesten Systeme unmittelbar nach ihrer Herstellung noch nicht ihre endgültige Struktur besitzen. Aus diesem Grunde ließ



er seine Modellsysteme auf Basis der Wollwachsalkoholsalbe stets drei Tage ruhen, bis er sie rheologischen Untersuchungen unterzog. Die Aussage, dass die Struktur des Thermogels also unmittelbar nach der Herstellung noch nicht vollständig ausgeprägt ist, konnte anhand der Darstellung der Deformation über der Schubspannung sehr gut abgelesen werden.

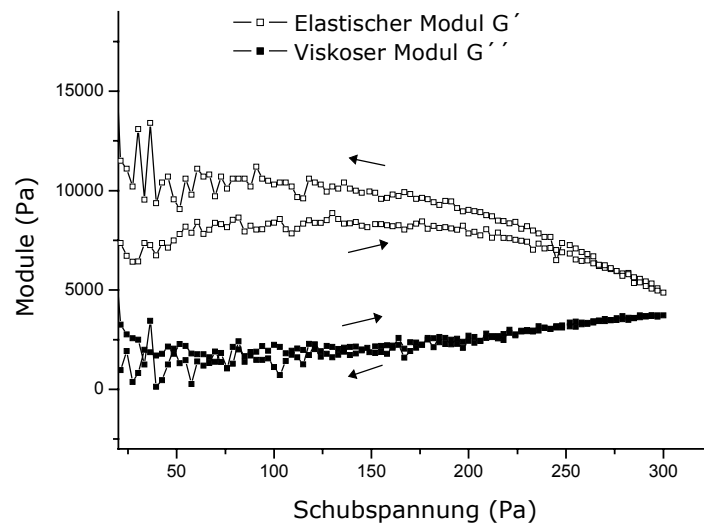


Abb. 4.10: Verlauf der oszillationsrheologischen Parameter  $G'$  und  $G''$  für Thermogel, unmittelbar nach der Herstellung aufgenommen,  $n = 8$

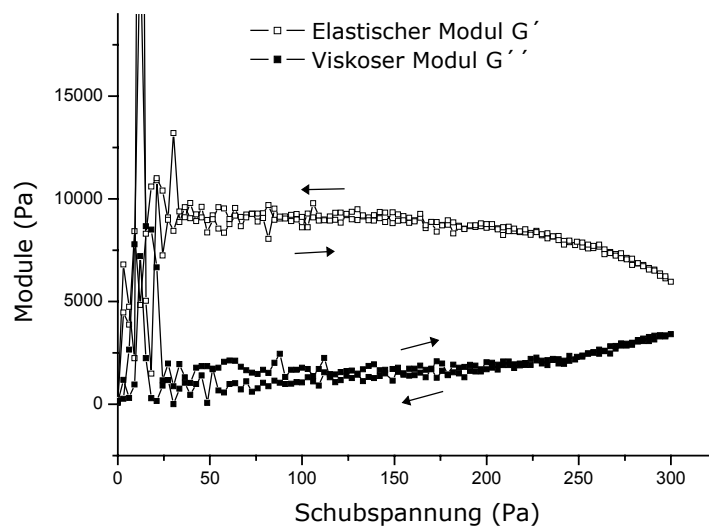


Abb. 4.11: Verlauf der oszillationsrheologischen Parameter  $G'$  und  $G''$  für Thermogel, 1 Tag bei RT gelagert,  $n = 2$

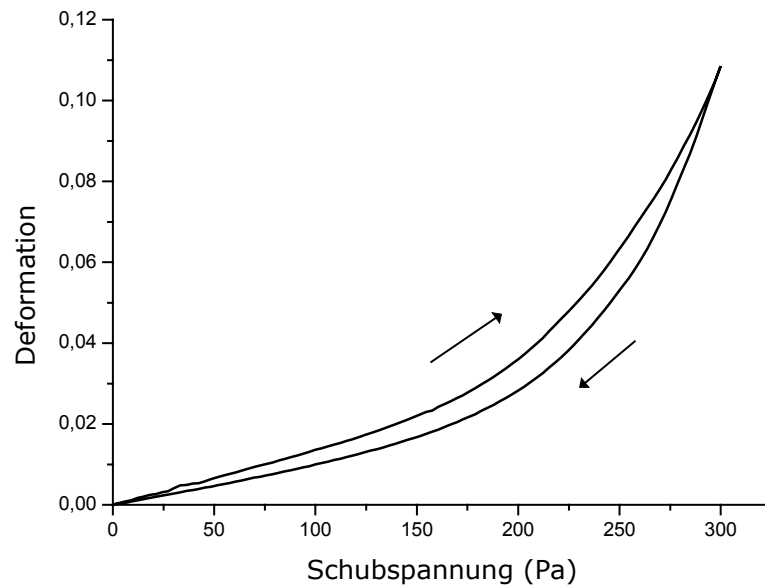


Abb. 4.12: Rheogramm von Thermogel im Oszillationsmodus, unmittelbar nach der Herstellung aufgenommen,  $n = 8$

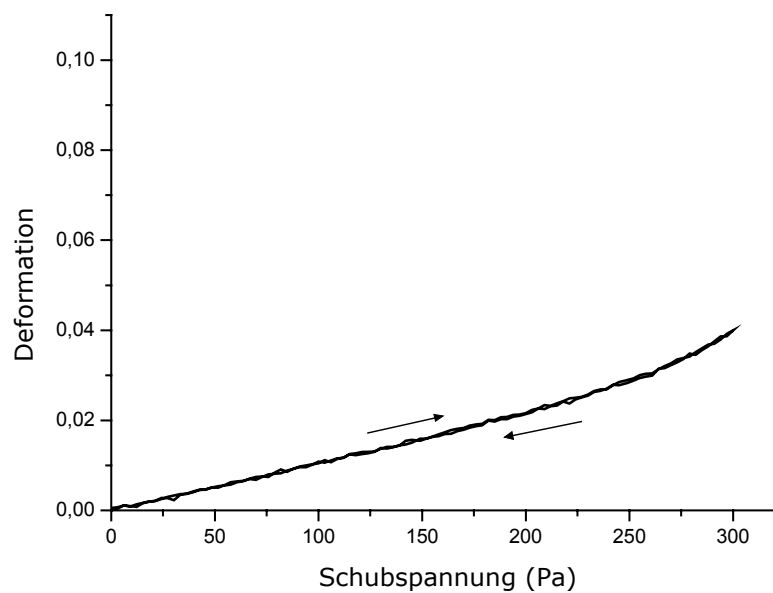


Abb. 4.13: Rheogramm von Thermogel im Oszillationsmodus, 1 Tag bei RT gelagert,  $n = 2$

#### **4.2.4 Einfluss von Salzen auf das Fließverhalten von Thermogel**

##### **4.2.4.1 5-ALA**

Da 5-ALA für die späteren Permeationen in einer Konzentration von 10 % (m/m) eingesetzt werden sollte, wurde das Thermogel mit einer Konzentrationsreihe von 1, 5 und 10 % 5-ALA (m/m) untersucht, um einen eventuellen Konzentrationseinfluss zu erkennen. Die Messungen wurden unmittelbar nach der Inkorporierung des Salzes in das 1 Tag gelagerte Thermogel durchgeführt. Abb. 4.14 verdeutlicht den Einfluss des Arzneistoffs 5-ALA auf das Fließverhalten des Thermogels. Es wird deutlich, dass das Rheogramm von Thermogel mit 1 % 5-ALA dem des reinen Thermogels sehr ähnelt, bei beiden erscheinen Auf- und Abwärtskurve deckungsgleich. Das 5-ALA-haltige Gel ist jedoch weniger stark deformierbar, verfügt also zu jedem Messzeitpunkt über eine höhere Komplexe Viskosität. Wird der Gehalt an 5-ALA auf 5 % gesteigert, treten deutliche Änderungen im Fließverhalten gegenüber der wirkstofffreien Formulierung auf. Das System zeigt deutlich stärkere Scherverdünnung und kann unter den gewählten Versuchsbedingungen bis zu einem höheren Maximalwert deformiert werden. Der Verlauf der Abwärtskurve weist auf rheopexes Fließverhalten hin (Abwärtskurve liegt unterhalb der Aufwärtskurve), das System verfestigt sich also. Bei einem 5-ALA-Gehalt von 10 % zeigt das System Thixotropie und einen um 43 % gesteigerten Maximalwert der Deformation im Vergleich zur 5 %igen 5-ALA-Zubereitung. 5-ALA in 5 %iger Konzentration scheint also nach Rücknahme der Scherbeanspruchung dem Strukturwiederaufbau zu assistieren, was sich in der Verfestigung widerspiegelt, während es höher konzentriert das System in seinem Wiederaufbau nach Scherbeanspruchung behindert, was das thixotrope Fließverhalten zeigt. Rose [1999] berichtete von einem verzögertem Gerüstaufbau bei WHS nach Kochsalzzugabe und vermutete, dass das NaCl sich an aufgebrochenen Gerüststrukturen anlagert und diese sowohl räumlich als auch über ionische Wechselwirkungen voneinander trennt. Dies kann als Erklärung für das Verhalten der 10 %igen Zubereitung herangezogen werden. In einem Anteil von 5 % kommt es zwar zunächst im Laufe der Aufwärtskurve zur Scherverdünnung, das Abwärtsdiagramm verdeutlicht allerdings Strukturverfestigung der 5 %igen Formulierung. Mit einer Konzentration des Salzes von 1 % ist die 5-ALA-Menge noch so gering, dass sie sich kaum auf die

Netzwerkausbildung der Formulierung nach Scherung auswirkt. Da diese Zubereitung weniger stark deformierbar ist als das reine Thermogel, kann sogar von einem die Struktur stärkenden Effekt der 5-ALA gesprochen werden. Der 5-ALA-Anteil ist in diesem Falle noch nicht hoch genug, als dass dadurch der Gerüstwiederaufbau behindert werden könnte. Da der Arzneistoff als Salz vorliegt, wird er im Thermogel hydratisiert vorliegen. Bilden die Wassermoleküle zu den Ionen eine größere Affinität als zu den Polymermolekülen aus, können die Polymerketten untereinander intensiver in Wechselwirkung treten. Damit verfestigt sich das System nach Zurücknahme der Beanspruchung wie z.B. mit einem 5-ALA-Anteil von 5 %. Wird hingegen die 5-ALA-Konzentration weiter gesteigert, kann von einer Art kritischen Konzentration gesprochen werden, die nun das Polymergerüst nach mechanischer Beanspruchung an seinem „Ausheilen“ behindert. Der 5-ALA-Gehalt ist so hoch, dass die Polymerketten evtl. durch ausgeprägte Hydrathüllen der Ionen räumlich getrennt und an Interaktionen gehemmt werden. Folglich geht der Wiederaufbau des Gerüsts mit zeitlicher Verzögerung vonstatten.

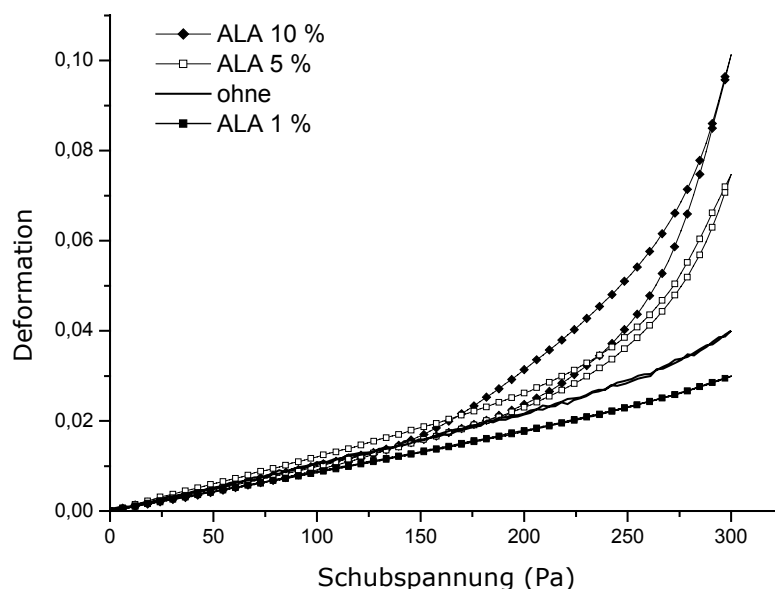


Abb. 4.14: Rheogramme im Oszillationsmodus von Thermogel mit 5-ALA in verschiedenen Konzentrationen,  $n = 2$ . Einarbeitung von 5-ALA erfolgte nach eintägiger Lagerung des Thermogels

#### 4.2.4.2 Kochsalz (NaCl)

Ob es sich bei den unter 4.2.4.1 vorgestellten Änderungen im Fließverhalten des Thermogels nach 5-ALA-Inkorporation um einen rein ionischen Effekt handelte, sollte mit einem weiteren Modellsalz überprüft werden. Dafür wurde eine Kochsalz-Reihe steigender Konzentration in das Thermogel eingearbeitet und rheologisch vermessen (Abb. 4.15). Kochsalz wurde als simple Modellsubstanz gewählt, da es ebenfalls wie 5-ALA-Hydrochlorid über Chlorid als Gegenion verfügt und leicht verfügbar war. Die folgenden Grafiken verdeutlichen, dass NaCl bis zu einem Massenanteil von 10 % keinen Einfluss auf das Fließverhalten des Thermogels hat. Alle Systeme weisen Scherverdünnung auf mit Tendenz zu leicht rheopexem Verhalten. Die Maximaldeformationen rangieren alle innerhalb ihrer Standardabweichungen (nicht aufgeführt wegen Unübersichtlichkeit der Grafik), sie unterscheiden sich folglich nicht signifikant. Eine geringe Tendenz zur Verfestigung des Systems ist erkennbar, die mit steigendem NaCl-Gehalt zunimmt, was sich in einer Verminderung der Maximaldeformation bemerkbar macht. NaCl mit einem Massenanteil von 3,5 % wurde eingesetzt, da dies der gleichen Stoffmenge an 5-ALA entspricht, die mit einem Massenanteil von 10 % in Thermogel eingearbeitet wird. Dies entspricht einer Molalität von 0,6 und gibt die Stoffmenge in mol pro kg Lösungsmittel an. Wenn es sich bei dem Salzeinfluss also um einen rein stoffmengenabhängigen Effekt handelte, müssten die Rheogramme von Thermogel mit 5-ALA 10 % und Thermogel mit NaCl 3,5 % einen identischen oder zumindest sehr ähnlichen Verlauf zeigen. Da dies nicht der Fall ist, müssen weitere Parameter wie z.B. das Ausmaß der Hydratisierung der Ionen eine Rolle spielen. Die hier kritische Konzentration liegt zwischen 5 und 10 % NaCl-Zusatz, da der 10 %ige NaCl-Zusatz eine Verzögerung des Gerüstwiederaufbaus des Geles verursacht. Die Rheogramme für 5-ALA und NaCl je 10 % ähneln sich vom Verlauf her, allerdings kann das 5-ALA-haltige Thermogel etwas stärker deformiert werden als das kochsalzhaltige.

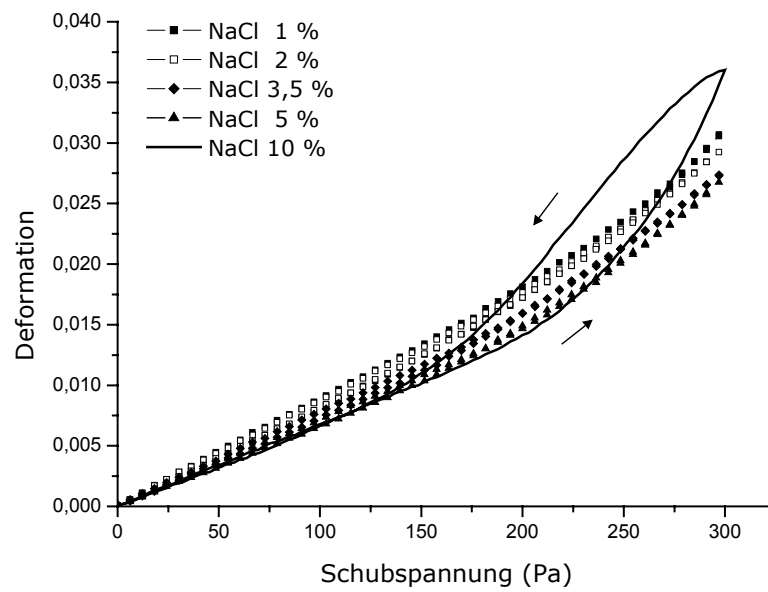


Abb. 4.15: Rheogramme im Oszillationsmodus von Thermogel mit Kochsalz verschiedener Konzentrationen,  $n = 2$ . Einarbeitung von NaCl erfolgte nach eintägiger Lagerung des Thermogels.

#### 4.2.4.3 *p*-Aminobenzoessäure

Als weitere Modellsubstanz wurde *p*-Aminobenzoessäure (*p*AB) ausgewählt, die neben einer Carboxylfunktion auch über eine Aminogruppe verfügt und somit dem 5-ALA-Molekül im Aufbau stärker ähnelt als Kochsalz. Während der Einarbeitung in die Formulierung mithilfe des Unguators® kam es zu apparenten Inkompatibilitäten. Das Thermogel verflüssigte sich ab einem *p*AB-Massenanteil von 4 %. Abb. 4.16 verdeutlicht dies. Betrachtet man zunächst nur die Aufwärtskurve, ist zu erkennen, dass sich sofort nach Beginn der Messung bei den 4 und 6 %igen Systemen eine annähernd konstante Fließfähigkeit einstellte, was charakteristisch für Flüssigkeiten ist. Die Diskrepanz zwischen Auf- und Abwärtskurve hingegen deutet auf eine gewisse Strukturviskosität hin. Die zwischen beiden Kurven eingeschlossene Hysteresisfläche verdeutlicht die Abweichung vom idealviskosen Verhalten. Ab einer Konzentration von 4 % behindert *p*AB die Ausbildung des Gerüsts derartig, dass es nicht zur Gelierung kommt. Durch den Einfluss der *p*AB könnten die Polymerketten in so kleine Assoziate zerstückelt worden sein, dass letztere keinen ausreichenden Kontakt zur Gerüstbildung mehr ausüben können. Je höher der Anteil an *p*AB, desto stärker macht sich dieser Effekt bemerkbar.

Die zweiprozentige Zubereitung mit *p*AB zeigt deutliche Scherverdünnung mit Verzögerung im Strukturaufbau bei Zurücknahme der Beanspruchung. Das System ist schon mit geringer Schubspannung scherbar, und die Abwärtskurve liegt oberhalb der Aufwärtskurve. Wird *p*AB mit einem Massenanteil von 1 % in das Thermogel eingearbeitet, scheint das Thermogel unter der gewählten Skalierung erst oberhalb von 200 Pa deformiert zu werden (s. Abb. 4.16, vergrößerter Ausschnitt). Auch dann bleibt das Ausmaß der möglichen Deformation jedoch sehr gering. Der direkte Vergleich des Rheogrammes des sofort nach seiner Herstellung vermessenen Thermogels macht hingegen die Ähnlichkeit mit der einprozentigen Zubereitung klar. Die Assoziate des frisch hergestellten Thermogels sind noch nicht so stark vernetzt wie nach einem Tag Lagerung (s. Abb. 4.10 und Abb. 4.11). Gering konzentriert (1 %ig) scheint *p*AB die Polymerassoziate in ähnlicher Weise zu verkleinern wie sie unmittelbar nach der Herstellung des Thermogels noch vorliegen. Abb. 4.17 und Abb. 4.18 verdeutlichen die Ähnlichkeit dieser beiden Systeme. Unter den Bedingungen des

Oszillationsmodus liegen sie jeweils als pseudoplastisch fließende Systeme mit der Tendenz zur Rheopexie vor. Ferner werden beide Zubereitungen bis zu einem ähnlich hohen Maximalwert deformiert.

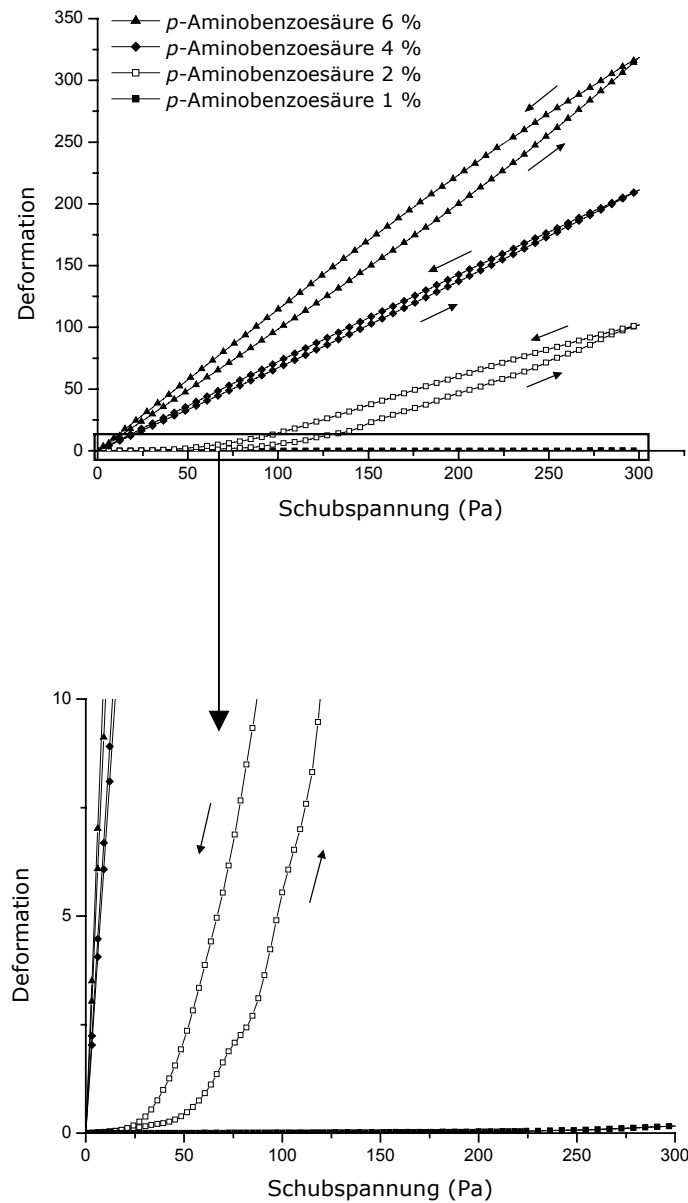


Abb. 4.16: Rheogramme im Oszillationsmodus von Thermogel mit *p*-Aminobenzoessäure verschiedener Konzentrationen, vergrößerter Ausschnitt (unten),  $n = 2$ . Einarbeitung von *p*AB erfolgte nach eintägiger Lagerung des Thermogels.



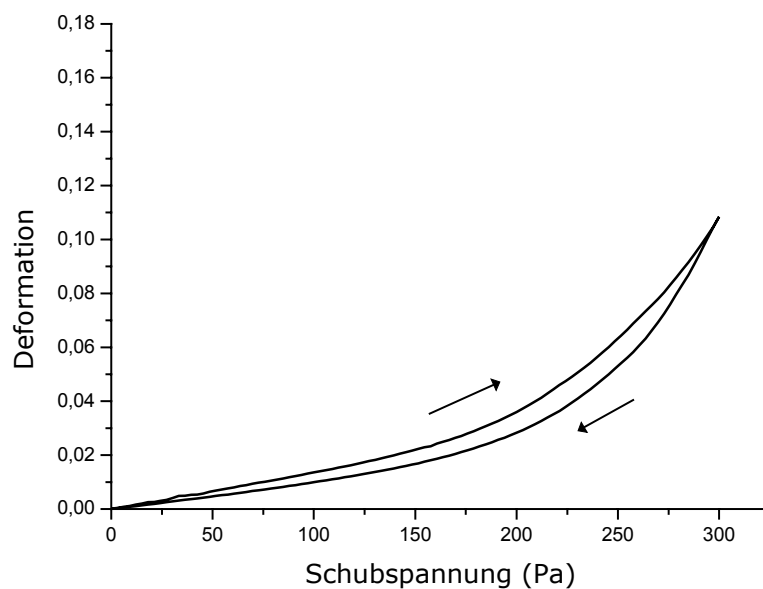


Abb. 4.17: Rheogramm von Thermogel im Oszillationsmodus, unmittelbar nach der Herstellung aufgenommen,  $n = 8$

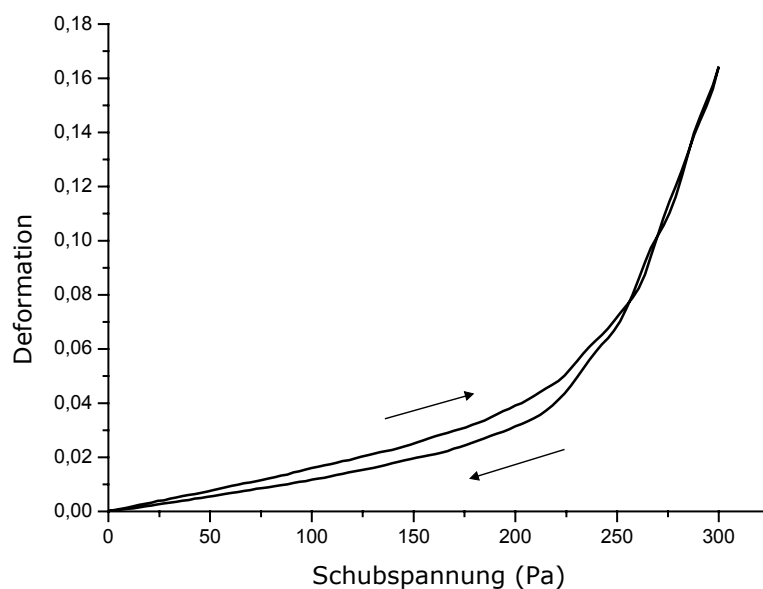


Abb. 4.18: Rheogramm von Thermogel mit *p*-Aminobenzoësäure 1 % (m/m),  $n = 2$ . Einarbeitung von *p*AB erfolgte nach eintägiger Lagerung des Thermogels.

#### **4.2.4.4 Zusammenfassung des Salzeinflusses auf das Fließverhalten von Thermogel**

Der vergleichende Blick auf den Einfluss der verschiedenen Salze auf das Fließverhalten von Thermogel zeigt, dass nicht die kolligativen Eigenschaften eines Salzes, sondern vornehmlich seine physikochemischen dabei eine Rolle spielen müssen. Gleiche Stoffmengen von Kochsalz und 5-ALA bewirkten nicht die gleichen Änderungen des Fließverhaltens des Thermogels. Unterschiede in der Beschaffenheit des Salzes wie z.B. die Polarität und damit das Ausmaß der Hydratisierung können als Einfluss nehmende Parameter angenommen werden. Fest steht, dass bei allen Salzen eine gewisse kritische Konzentration existiert, die den Wiederaufbau des Gelgerüsts nach Rücknahme einer Scherbeanspruchung verzögert (Thixotropie). Bei *p*-Aminobenzoessäure ist diese kritische Konzentration früher erreicht als bei den anderen beiden Salzen. Sie zerstört schon in relativ geringer Konzentration die Gerüststruktur des Gels, so dass sich das System verflüssigt, und der elastische Charakter vollständig verloren geht.

#### **4.2.5 Einfluss der 5-ALA-Konzentration auf Gelierung von Thermogel**

Wie unter 4.2.4.1 beschrieben, hat die 5-ALA-Konzentration einen erheblichen Einfluss auf das rheologische Verhalten des Thermogels. Inwiefern sich der Arzneistoff auf den Sol/Gel-Übergang auswirkt, erkennt man anhand der Aufzeichnung der Module  $G'$  und  $G''$ , sowie des Phasenverschiebungswinkels gegen die Temperatur. Abb. 4.19 macht deutlich, dass der Sol-Gel-Übergang mit steigender Konzentration an 5-ALA zu geringeren Temperaturen verschoben wird. In der Kälte überwiegen offensichtlich die viskosen Anteile des reinen Thermogels, erst ab einer Temperatur von 12,7 °C beginnen die elastischen Eigenschaften zu überwiegen. Im Falle der 5 % 5-ALA-haltigen Zubereitung setzt dieses Phänomen schon bei 10,6 °C ein. Wird der 5-ALA-Massenanteil weiter auf 10 % gesteigert, wird der Sol/Gel-Übergang zu einer Temperatur von 7 °C verschoben. Die oszillationsrheologischen Untersuchungen ermöglichen neben der Begutachtung der viskosen und elastischen Anteile auch den Verlauf des

Phasenverschiebungswinkels, der  $45^\circ$  beträgt, wenn  $G'$  und  $G''$  gleich groß sind. Je kleiner dieser ist, desto ausgeprägter sind die elastischen Eigenschaften des Systems. Abb. 4.19 zeigt anschaulich, wie der Phasenverschiebungswinkel kleiner wird, während  $G'$  zunimmt. Die Verringerung der Gelbildungstemperatur mit steigendem 5-ALA-Gehalt kann als eine Art Aussalzungseffekt beschrieben werden. Ricci et al. [2002] berichten, dass Anionen wie  $\text{Cl}^-$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  den Sol/Gel-Übergang zu geringeren Temperaturen verschieben. Dadurch, dass diese Salze in wässrigem Medium Ionen bilden und von einer Hydrathülle umgeben sind, stehen weniger Wassermoleküle zur Bildung von Wasserstoffbrücken mit den Polymermolekülen zur Verfügung, wodurch diese stärker untereinander in Wechselwirkung treten, und es zur Gelierung kommt.

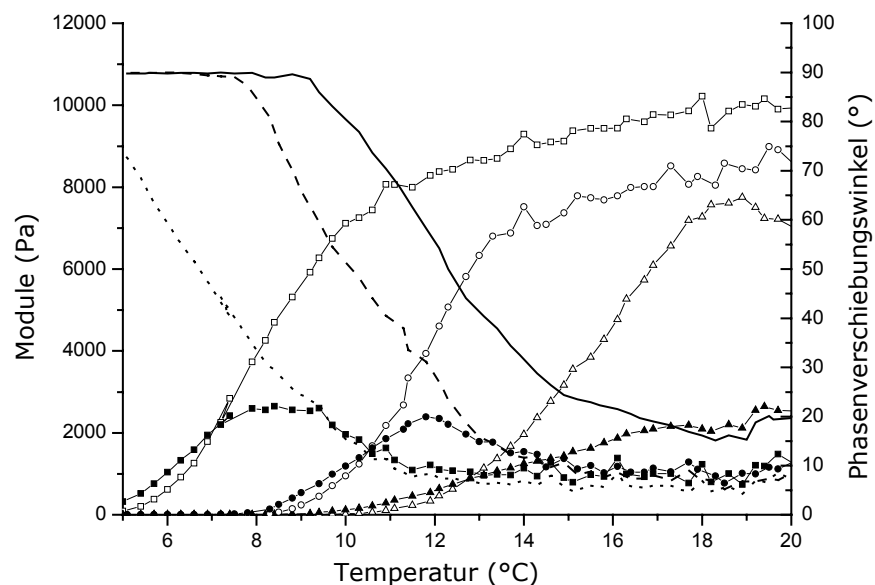


Abb. 4.19: Korrelation zwischen der 5-ALA-Konzentration und der Gelbildungstemperatur des Thermogels; elastischer Modul  $G'$  ( $\square$ -), viskoser Modul  $G''$  ( $\blacksquare$ -) und Phasenverschiebungswinkel (.....) von Thermogel mit 5-ALA 10 % (m/m);  $G'$  ( $\circ$ -),  $G''$  ( $\bullet$ -) und Phasenverschiebungswinkel (--) von Thermogel mit 5-ALA 5 % (m/m),  $G'$  ( $\triangle$ -),  $G''$  ( $\blacktriangle$ -) und Phasenverschiebungswinkel (—) von reinem Thermogel

#### 4.2.6 Einfluss des pH-Wertes auf die Fließeigenschaften von Thermogel

Um einen eventuellen Einfluss des pH-Wertes auf die Fließeigenschaften des Thermogels zu erkennen, wurde es mit Puffer verschiedener pH-Werte hergestellt und rheologisch untersucht. Das auf herkömmliche Weise mit bidestilliertem ungepuffertem Wasser hergestellte Thermogel wies nach Herstellung einen pH-Wert von 2,87 auf. Wurde Wasser verwendet, das auf einen pH-Wert von 7,00 (Phosphat-Pufferlösung pH 7,00, DAB 10, 0,067 M) gebracht wurde, resultierte ein pH-Wert für das Thermogel von 6,20, auf pH 5,54 gepuffertes Wasser (Phosphat-Pufferlösung pH 5,5, DAB 10, 0,01 M) generierte Thermogel mit einem pH-Wert von 3,48. Abb. 4.20 zeigt, dass Doppelmessungen des jeweiligen Thermogels keine nennenswerten Unterschiede ergeben. Die Salzkonzentration der Puffer ist zu gering, als dass sie einen Einfluss auf die Gerüststrukturen haben könnte, der sich z.B. in einer vergrößerten Hysterisisfläche bemerkbar machen könnte. Das bedeutet, dass die pH-Variationen zwischen pH 2,87 und 6,20 keinen Einfluss auf das wirkstofffreie Thermogel in Bezug auf sein rheologisches Verhalten haben.

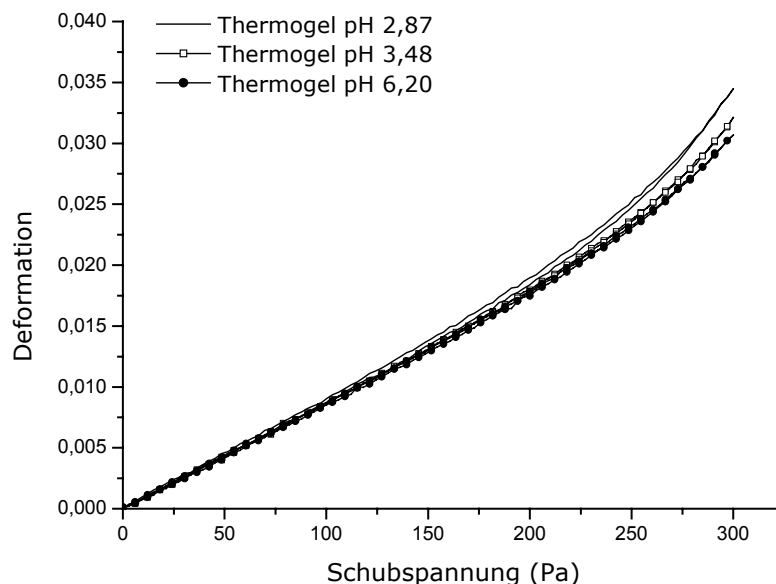


Abb. 4.20: Rheogramm von Thermogel verschiedenen pH-Wertes,  $n = 2$

### 4.3 Permeation von 5-ALA aus Modellgrundlagen

Die Arzneistoffdiffusion durch eine Barriere wie es z.B. humanes Stratum corneum darstellt, kann mit dem Flux ( $J$ ) und dem Permeationskoeffizienten ( $P$ ) beschrieben werden. Gemäß 2.5.7 wird aus dem linearen Kurvenabschnitt der Permeationskurven der Flux direkt abgelesen. Je steiler der Konzentrationsgradient zwischen Vehikel und Stratum corneum ausfällt, desto höher ist der Flux. Loth [1991] arbeitete den Einfluss des Vehikels auf die transdermale Arzneistoffpenetration heraus. Er beobachtete die Permeation des Modellarzneistoffes Indomethacin durch exzidierte menschliche Haut aus verschiedenen halbfesten Grundlagen, die mit Penetrationsenhancern wie Oleyloleat oder Isopropylmyristat angereichert waren. Penetrationsfördernde Substanzen migrieren wie der Arzneistoff in das Stratum corneum, stören das Arrangement der Lipide und verflüssigen mitunter das interzelluläre Material. Die Folge ist ein verminderter Diffusionswiderstand.

Abb. 4.22 zeigt das Permeationsverhalten für 5-ALA aus dem neu entwickelten Ringing-Gel im Vergleich zu den Arzneibuchgrundlagen Basiscreme und WHS. Das Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel (FAM) wurde ebenfalls in die Studien mit einbezogen, da frühere Untersuchungen aus unserer Forschungsgruppe gezeigt haben, dass dieses die 5-ALA-Permeation fördert [Winkler und Müller-Goymann, 2002].

Während erst nach einer Verzögerungszeit, einer Lag-Phase, messbare Mengen an 5-ALA aus der WHS das Stratum corneum passiert haben, hat die 5-ALA-Permeation aus Basiscreme DAC bereits vor dem ersten Probenzug nach 300 min begonnen. Die zum Zeitpunkt des ersten Probenzuges aus der Basiscreme permeierte Menge ist bereits ungefähr 5-fach größer als die Menge aus WHS. Die Permeation von 5-ALA aus der Basiscreme dominiert über den gesamten Versuchszeitraum und erreicht einen doppelt so hohen Endwert im Vergleich zu WHS. Die Permeationskurve für 5-ALA aus WHS zeigt einen deutlichen Anstieg zwischen 300 und 480 min Versuchsdauer, der danach etwas zurückgeht und auf annähernd gleichem Niveau bis zum Ende des Experimentes verbleibt. Des Weiteren ist für 5-ALA aus Dolgit® Mikrogel ebenfalls eine Verzögerungszeit im Zusammenhang mit der Stratum corneum Permeation zu beobachten. Nach 480 min bzw. 300 min sind vergleichbare Mengen an 5-ALA aus dem

Fertigarzneimittel und der WHS permeiert. Je länger die Versuchsdauer, desto stärker steigt die Permeationskurve für 5-ALA aus dem kommerziell erhältlichen Dolgit® Mikrogel. Am Versuchsende werden daraus 3 Mal so große Werte für 5-ALA gefunden wie aus WHS. Die Permeationskurve von 5-ALA aus Dolgit® Mikrogel zeigt zunächst einen recht langsamen Anstieg bis 480 min, der danach bis ca. 1660 min stärker zunimmt. Jenseits von 1660 min Versuchsdauer nimmt der Flux für 5-ALA dann nochmals zu. Die effektivste 5-ALA Permeation erfolgt allerdings mit einem Flux von  $121 \cdot 10^{-10} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$  aus dem Thermogel. Abb. 4.22. verdeutlicht, dass unter der gewählten Probenzugfrequenz keine Lag-Zeit vorliegt. Die permeierte 5-ALA-Menge ist nach 5 h 80 Mal, nach 8 h 25 Mal, und nach 11 h 23 Mal größer als die jeweilige 5-ALA-Menge aus Dolgit® Mikrogel. Tabelle 4.2 (S. 82) fasst die Permeationsdaten für 5-ALA aus den untersuchten Zubereitungen zusammen. Abb. 4.21 stellt die Flux-Daten für 5-ALA aus verschiedenen Grundlagen dar.

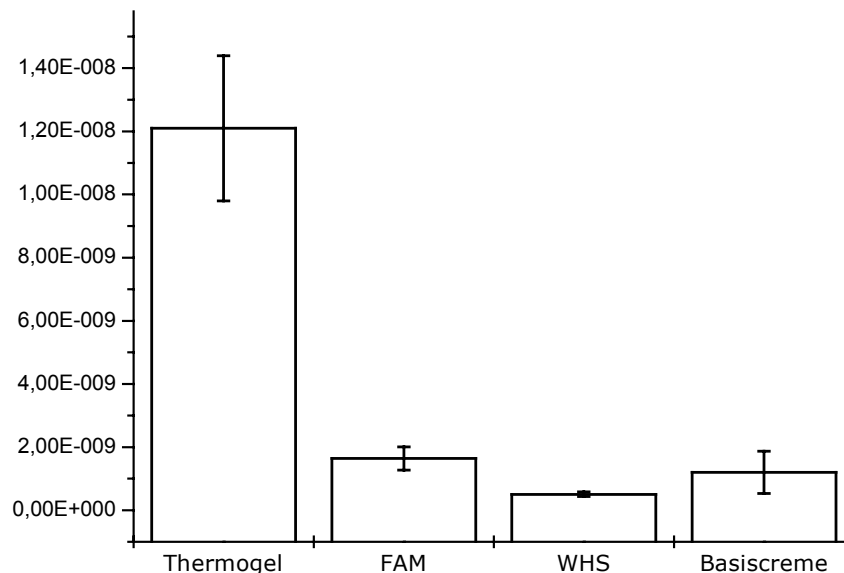


Abb. 4.21: 5-ALA-Flux J [ $\text{g/cm}^2 \cdot \text{s}$ ] aus verschiedenen Zubereitungen (n = 5,  $\pm$  Standardabweichungen)

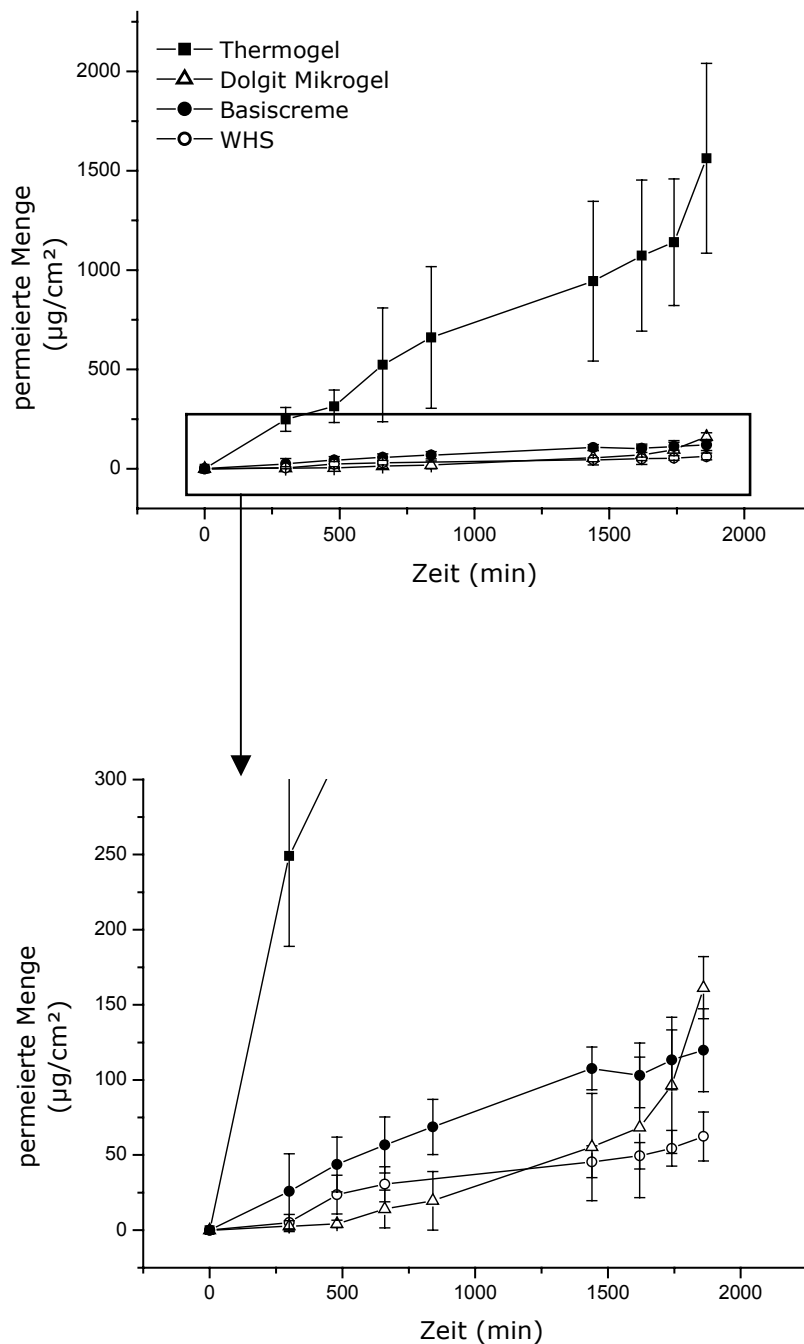


Abb. 4.22: Permeation von 5-ALA 10 % (m/m) aus verschiedenen Grundlagen,  $n = 5$ ; vergrößerter Ausschnitt unten, Hautspende weiblich (48 Jahre alt, Bauch)

Die Anreicherung der Arzneistoffe in der Hornschicht, und damit die verzögerte Nachweisbarkeit im Akzeptormedium bei Permeationsuntersuchungen (Lag-Zeit), kommt nach Loth [1979] in erster Linie durch einen um mehrere Zehnerpotenzen geringeren Diffusionskoeffizienten im Stratum corneum im Vergleich zu dem im Vehikel zustande. Daher diffundiert ein Arzneistoff nicht mit der gleichen Geschwindigkeit durch das Stratum corneum wie in der Grundlage [Loth, 1991]. Mit Konzentrationsprofilen verschiedener Arzneistoffe in der Hornschicht zeigte Loth [1986] einen plötzlichen Abfall des Konzentrationsgradienten an der Grenze der Grundlage zur Hornschicht. Den Substanzstau erklärte er mit dem Übergang des Arzneistoffes vom locker gepackten Stratum disjunctum zum dichter zusammenhängenden Stratum conjunctum. Ferner kann die Bindung an Proteine in der Epidermis die Lag-Phase verlängern und den Diffusionsfluss vermindern. Auf Grundlage der Fickschen Gesetze kann der zeitliche Verlauf der Diffusion durch eine Membran, wie z.B. das SC, graphisch dargestellt werden [Loth, 1987]. Durch Extrapolation des linearen Kurvenabschnittes, der die aus der Membran austretende Stoffmenge beschreibt, wird der Abszissenabschnitt ermittelt. Der unter Berücksichtigung des Diffusionskoeffizienten erhaltene Quotient stellt die Lag-Zeit nach Barrer [1939] dar (Gleichung 4-1). Sie gibt Auskunft darüber, in welchem Ausmaß ein Arzneistoff durch bzw. im SC zurückgehalten wird. Obwohl die Dicke der Hornschicht sehr gering ist, erscheinen die Zeiten, bis der Arzneistoff die Barriere durchdrungen hat, sehr lang. Dies ist damit zu erklären, dass der Diffusionskoeffizient für die meisten Stoffe im SC sehr klein ist, und die Schichtdicke mit der zweiten Potenz in die Gleichung eingeht (s. Gleichung 4-1).

$$t_L = \frac{h^2}{6D} \quad [\text{min}]$$

Gleichung 4-1

$t_L$  = Lag-Zeit

$h$  = Hornschichtdicke, angenommen als 15  $\mu\text{m}$

$D$  = effektiver Diffusionskoeffizient des Arzneistoffs durch die Hornhaut



Angewandt auf die Penetrationsprofile in Abb. 4.22, ist für die Arzneistoffdiffusion aus Thermogel durch SC nach den von uns gewählten Probenzugintervallen keine Lag-Zeit zu erkennen. Zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten wurde daher eine minimale Lag-Zeit von 1 min eingesetzt, wodurch sich für 5-ALA näherungsweise ein effektiver Diffusionskoeffizient ( $D$ ) durch SC von  $37,5 \mu\text{m}^2/\text{min}$  ergibt, wenn die Dicke das Stratum corneum als  $15 \mu\text{m}$  angenommen wird, wie es in der Literatur beschrieben ist [Loth, 1986]. Für die Basiscreme kann eine Lag-Zeit von 45,7 min, für die WHS eine Lag-Zeit von 257 min ermittelt werden. Das Dolgit® Mikrogel bewirkt eine Lag-Zeit von 420 min. Im Vergleich dazu beträgt  $D$  für 5-ALA aus Dolgit® Mikrogel  $0,09 \mu\text{m}^2/\text{min}$ , für Basiscreme  $0,82 \mu\text{m}^2/\text{min}$  und für WHS  $0,15 \mu\text{m}^2/\text{min}$ .

Um Schlüsse aus dem Penetrationsverhalten eines Arzneistoffes ziehen zu können, muss zunächst seine thermodynamische Aktivität in der entsprechenden Zubereitung betrachtet werden. Da die Zubereitungen der vorliegenden Studie 5-ALA komplett gelöst enthielten, wurde ihre thermodynamische Aktivität als annähernd gleich angenommen. Dabei wurde vernachlässigt, dass 5-ALA in eine spezielle Mikrostruktur der Grundlage eingebunden sein könnte, die für WHS in der Literatur beschrieben wird [Junginger et al., 1981]. Da die Permeation viel langsamer abläuft als die Freigabe, ist prinzipiell das Stratum corneum der limitierende Faktor und nicht das Vehikel. Für den Fall, dass nur die thermodynamische Aktivität ausschlaggebend für das Permeationsverhalten des Arzneistoffes ist, müssten die Permeationsdaten andere Ergebnisse liefern. Aufgrund seiner hohen Löslichkeit und Hydrophilie wird 5-ALA vor allem in den Wasserkompartimenten der Zubereitungen lokalisiert sein. Da Basiscreme mit 40 % (m/m) den geringsten Wasseranteil besitzt, wird die thermodynamische Aktivität von 5-ALA in dieser Zubereitung die größte sein. Folglich müsste der Arzneistoff hieraus auch den größten Flux zeigen. WHS mit einem Wasseranteil von 70 % (m/m) offenbart den geringsten 5-ALA-Flux. Betrachtet man lediglich diese beiden Formulierungen, kann das Permeationsverhalten für 5-ALA mit ihrer unterschiedlichen thermodynamischen Aktivität darin erklärt werden. Bezieht man aber die Permeationsdaten für 5-ALA aus Thermogel mit ein, wird deutlich, dass die stark verbesserte Permeation aus diesem Vehikel im Vergleich zu den Arzneibuchgrundlagen auf andere Mechanismen wie z.B. eine intensive Veränderung der Mikrostruktur des Stratum corneum zurückzuführen sein muss.

Thermogel verfügt über einen Wasseranteil von 50 % (m/m) und müsste einen Flux für 5-ALA aufweisen, der zwischen dem aus WHS und Basiscreme liegt, wenn nur die thermodynamische Aktivität des Arzneistoffes für das Permeationsverhalten verantwortlich wäre. Da dies nicht der Fall ist, und aus Thermogel der mit Abstand größte 5-ALA-Flux ermittelt wird, besteht hier keine Korrelation zwischen dem Flux und der thermodynamischen Aktivität.

Zur Erklärung des geringen Fluxes für 5-ALA aus WHS können auch die strukturellen Gegebenheiten des Systems eine Rolle spielen, die die Freigabe des Arzneistoffes beeinflussen. Für die WHS ist bekannt, dass ölige und wässrige Kompartimente durch ein hochgeordnetes Lipidgerüst voneinander getrennt sind [Bauer et al., 1999]. Eine Doppelschicht aus Fettalkohol und Fettalkoholsulfat grenzt die Paraffinvolumenelemente von den Wasserkompartimenten ab. Neben freiem Bulk-Wasser befindet sich ein gewisser Anteil interlamellaren Wassers zwischen den Doppelschichten aus Emulgator-Mischkristallinat, wodurch eine hydrophile Gelphase ausgebildet wird. Wird ein Arzneistoff in eine solche Domäne aufgenommen, kann seine Diffusion aus der Grundlage heraus verlangsamt sein. Der Wasseranteil der WHS ist mit 70 % (m/m) sehr hoch, und die 5-ALA wird aufgrund ihrer hohen Hydrophilie ( $\log P$  Oktanol/Wasser = -1,51 [Uehlinger et al., 2000]) sehr wahrscheinlich darin lokalisiert sein. Es ist folglich unwahrscheinlich, dass sie sich in den anteilmäßig viel geringer vorhandenen lipophilen Bereichen mit Paraffin befindet. Trotzdem kann ihre Diffusion behindert sein, wenn sie aus den wässrigen Bereichen heraus durch die Tensid-Doppelschicht durch das Vehikel gelangen soll. Damit ist die Freigabe relativ langsam, und es diffundiert pro Zeit auch weniger Substanz in das Stratum corneum.

Mit der Basiscreme liegt ein amphiphiles System mit flüssigkristallinem Gelgerüst vor. Bei ihr kann nicht zwischen einer äußeren und inneren Phase unterschieden werden, da sie eine trikohärente Struktur aufweist. Sie setzt sich zusammen aus einer Emulgatorphase, bestehend aus einem teilweise gequollenen Gelgerüst, einer wässrigen Phase, die aus einem vollständig gequollenen Gelgerüst besteht, sowie aus einer kohärenten Lipidphase [Daniels und Knie, 2006]. Der hohe Anteil an sowohl O/W- als auch W/O-Emulgatoren macht es möglich, lipophile und hydrophile Stoffe aufzunehmen. Diese Substanzen eignen sich potenziell, in Interaktion mit der Mikrostruktur des SC zu treten, und es damit durchlässiger für 5-ALA zu machen. Die eben beschriebene Struktur verdeutlicht, dass die 5-

ALA hier mehr Möglichkeiten hätte, relativ ungehindert in hydrophilen Bereichen zu diffundieren. Das kann sich dann in einer schnelleren Freigabe aus dem Vehikel und früherem Kontakt mit dem Stratum corneum äußern.

Die herausragende Verbesserung der Permeation von 5-ALA aus dem Thermogel ist allerdings nicht nur mit einer schnelleren Freisetzung aus dem System erklärbar. Die Gesamtkomposition wirkt sich stark auf die Lipidstruktur des Stratum corneum aus. Neben 5-ALA können auch die Penetrationsenhancer in das Stratum corneum bzw. in seine interzellulären Räume diffundieren. In Übereinstimmung mit Literaturdaten interagieren sie, von Kapillarkräften angesogen, mit interzellulären Strukturen und schleusen gelöste Arzneistoffmoleküle durch das Stratum corneum [Loth, 1991]. Die Mikrostruktur des Stratum corneum ist verändert bzw. die Stratum corneum-Permeabilität ist durch das neue Gel erheblich gesteigert worden.

Zum Einen kann dies auf den relativ hohen Anteil an IPA zurückgeführt werden, da Alkohole bekannt dafür sind, Lipide extrahieren zu können, die für die Barriereigenschaften des Stratum corneum essentiell sind. Zum Anderen liegt mit dem Poloxamer des Thermogels ein oberflächenaktiver Stoff in hoher Konzentration vor, der mit der Mikrostruktur des Stratum corneum interagieren kann, was schon für andere kommerziell erhältliche flüssigkristalline Systeme zur dermalen Anwendung bekannt ist [Müller-Goymann, 2004]. Allerdings treffen diese Aussagen auch auf das qualitativ sehr ähnlich zusammengesetzte Dolgit® Mikrogel zu und erklären nicht den um den Faktor 7,4 größeren 5-ALA-Flux durch SC aus Thermogel. Durch die intensive Veränderung der Mikrostruktur des Stratum corneum ist eine erhöhte Permeabilität für 5-ALA erreicht worden, und das Ausmaß dieser Interaktionen sollte mit DSC-Messungen an SC weiter untersucht werden.

Dolgit® Mikrogel ist wie das Thermogel ein flüssigkristallines Tensidgel mit Resonanzeffekten im hörbaren Bereich. Die Struktur des Thermogels ist noch nicht hinreichend geklärt. Es wird allerdings eine kubische Phase für sehr wahrscheinlich angenommen, da es unter dem Polarisationsmikroskop isotrop erscheint.

Tabelle 4.2: Permeationsdaten für 5-ALA aus verschiedenen Formulierungen,  $n = 5$ ; Verschlechterung der 5-ALA-Permeation, berechnet aus dem Quotienten der betreffenden Formulierung und Thermogel. Quotienten für Flux und Permeationskoeffizient von Thermogel wurden als 1 gesetzt.

Donor mit 5-ALA 10% (m/m)	Flux J [g/cm <sup>2</sup> · s]	Permeations- koeffizient P [cm/s]	Quotient: $\frac{\text{Zubereitung}}{\text{Thermogel}}$	
			J	P
Thermogel	$121 \cdot 10^{-10}$ $\pm 23,9 \cdot 10^{-10}$	$937 \cdot 10^{-10}$ $\pm 1,85 \cdot 10^{-8}$	1	1
Dolgit® Mikrogel	$16,4 \cdot 10^{-10}$ $\pm 3,69 \cdot 10^{-10}$	$147 \cdot 10^{-10}$ $\pm 33,0 \cdot 10^{-10}$	0,14	0,16
Basiscreme DAC	$12,0 \cdot 10^{-10}$ $\pm 6,67 \cdot 10^{-10}$	$127 \cdot 10^{-10}$ $\pm 70,5 \cdot 10^{-10}$	0,10	0,14
Wasserhaltige Hydrophile Salbe (WHS)	$5,08 \cdot 10^{-10}$ $\pm 7,39 \cdot 10^{-11}$	$48,4 \cdot 10^{-10}$ $\pm 7,04 \cdot 10^{-10}$	0,04	0,05

## **4.4 Thermoanalytische Untersuchungen an exzidiertem humanen Stratum corneum**

### **4.4.1 DSC-Messungen**

Um den Effekt des Thermogels und der anderen Formulierungen auf die Lipidmatrix des Stratum corneum zu untersuchen, wurden thermoanalytische Untersuchungen durchgeführt. Die dynamische Differenzkalorimetrie ermöglicht die Detektion von Umwandlungsenthalpien, die durch physikalische oder chemische Vorgänge in einer Probe verursacht werden. Solche Umwandlungen können z.B. flüssigkristalline Phasenübergänge sein, die sich durch endotherme Peaks im Thermogramm erkennen lassen. Die jeweils reinen Grundlagen zeigten in Vorversuchen im gewählten Temperaturbereich keinerlei Signale.

Die begrenzte Menge an Hautprobe, die auch für die Permeationsuntersuchungen in Kapitel 4.3 eingesetzt wurde, erlaubte zunächst nur DSC-Einfachmessungen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben, dass mit Thermogel behandeltes SC Verschiebungen zu geringeren Temperaturen von 8,0 °C für T2 und 7,3 °C für T3 aufweist, während WHS (5,3 °C, 3,6 °C) und Basiscreme (7,3 °C, 5,1 °C) geringere Verschiebungen zeigten (s. Tabelle 4.3 und Abb. 4.23). Dieser Trend konnte anschließend mit Mehrfachmessungen an einer weiteren Hautprobe bestätigt werden. Diese ergänzenden Studien untermauerten die Ergebnisse der Einfachmessungen und ermöglichten außerdem die Einbeziehung von Dolgit® Mikrogel.

Unbehandeltes, auf einen Wassergehalt von 20 % hydratisiertes Stratum corneum zeigte zwei deutliche endotherme Peaks bei 68,5 °C und 78,7 °C innerhalb des untersuchten Temperaturbereiches (s. Tabelle 4.4, Abb. 4.24). Da die Phasenübergänge von T1 und T4 nicht bei jeder Probe detektiert werden konnten, wurden die Untersuchungen auf T2 und T3 konzentriert. Der mit T2 bezeichnete Phasenübergang bei ca. 70 °C wird durch das Schmelzen der lamellaren Lipidschichten verursacht. Der Phasenübergang bei ca. 80 °C (T3) beruht auf einem Übergang Protein assoziierter Lipide vom Gel- in den flüssigen Zustand (s. 2.5.4). Verschiebungen der thermalen Übergänge der Lipide zu

geringeren Temperaturen werden generell mit einer erhöhten Fluidität der SC-Lipide gleichgesetzt, was mit einer Permeationsförderung einhergeht.

Für mit Thermogel vorbehandeltes SC ergaben sich Verschiebungen der Phasenübergänge zu geringeren Temperaturen von 4,6 °C (T2) und 4,3 °C (T3), während das Fertigarzneimittel Verschiebungen von 4,1 °C (T2) und 3,3 °C (T3) bewirkte (Abb. 4.24, Tabelle 4.4). Basiscreme (2,0 °C für T2, 0,2 °C für T3) und WHS (1,4 °C für T2, 0,6 °C zu höheren Temperaturen für T3) vermochten keinerlei über statistische Schwankungen hinausgehenden Einfluss auf SC Lipide auszuüben, da dies gemäß Leopold und Lippold [1995] nur der Fall ist, wenn Verschiebungen von mehr als 3 °C auftreten. Ferner ist bekannt, dass Wasser permeationsfördernde Eigenschaften besitzt. Winkler und Müller-Goymann [2005] fanden Verschiebungen von 2,4 °C (T2) und 2,0 °C (T3) für komplett hydratisiertes Stratum corneum im Vergleich zu nicht hydratisiertem. Damit kann für Thermogel und Dolgit® Mikrogel von einem Effekt auf die SC-Lipide gesprochen werden, der auf ihre spezifische Struktur zurückführbar ist, da sie trotz ihres hohen Wassergehaltes Verschiebungen von mehr als 2 °C bewirken.

Tabelle 4.4 fasst die jeweiligen Phasenumwandlungstemperaturen für T2 und T3 zusammen. Trotz der unterschiedlichen Herkunft der Hautproben ist eine Korrelation mit den Permeationsuntersuchungen dennoch möglich, da Thermogel als die Zubereitung benannt werden kann, die die höchste 5-ALA-Permeabilität des SC verursacht hat. Die Reihenfolge des Einflusses der betreffenden Zubereitungen auf die Phasenübergangstemperaturen der SC Lipide war die gleiche wie bei der ersten Hautprobe. Thermogel hatte den größten Einfluss, gefolgt von Basiscreme und WHS. Der Unterschied bestand lediglich im Ausmaß der Verschiebungen. Es wird deutlich, dass Dolgit® Mikrogel die Anordnung der SC Lipide fast so stark beeinflusst wie Thermogel, in den Permeationsuntersuchungen aber weit hinter ihm zurückbleibt. Die alleinige Aufweitung der Bilayer-Strukturen des Stratum corneum reicht also nicht aus, um die Permeation von 5-ALA wie aus Thermogel im Vergleich zu Basiscreme und WHS zu steigern. Der große Unterschied zum Dolgit® Mikrogel muss also in der veränderten quantitativen Zusammensetzung des Thermogels begründet liegen, vor allem in Hinsicht auf die Quantität der Löslichkeit verbessernden Substanzen. Es ist anzunehmen, dass der Anteil dieser Substanzen wie DMIS und IPA (zusammen 25 %) im Thermogel deutlich größer ist als im Dolgit® Mikrogel,

dessen präzise quantitative Zusammensetzung nicht bekannt ist. Damit würde sich ihre erhöhte Konzentration im Falle ihrer Diffusion in den Interzellularraum des Stratum corneum in der Weise bemerkbar machen, dass sie die Löslichkeit der polaren 5-ALA in lipophileren Bereichen verbessern und damit die Passage von 5-ALA erleichtern. In der Zubereitung selbst spielen IPA und DMIS als Lösungsmittel für 5-ALA eine untergeordnete Rolle, da letztere sehr hydrophil und in beiden Zubereitungen sehr gut löslich ist.

Der starke Einfluss des Thermogels auf die SC-Lipide sollte weiterführend dahingehend untersucht werden, ob eine spezielle Komponente des Thermogels die starke Veränderung des SC bewirkt oder die Kombination gewisser Bestandteile gemeinsam. Z.B. ist IPA allgemein als Permeationsförderer anerkannt, während DMIS lediglich als Lösungsvermittler bekannt ist. Inwiefern also synergistische Effekte der Bestandteile auch in Hinsicht auf das Permeationsverhalten eine Rolle spielen, sollten DSC-Untersuchungen von Thermogel-Variationen aufzeigen (s. Kap. 4.5.4).

Tabelle 4.3: Phasenumwandlungstemperaturen für T2 und T3 von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung mit verschiedenen Grundlagen.

Stratum corneum behandelt mit	T2 [°C]	T3 [°C]
Ø	69,5	82,1
WHS	64,2	78,5
Basiscreme	62,2	77,0
Thermogel	61,5	74,8

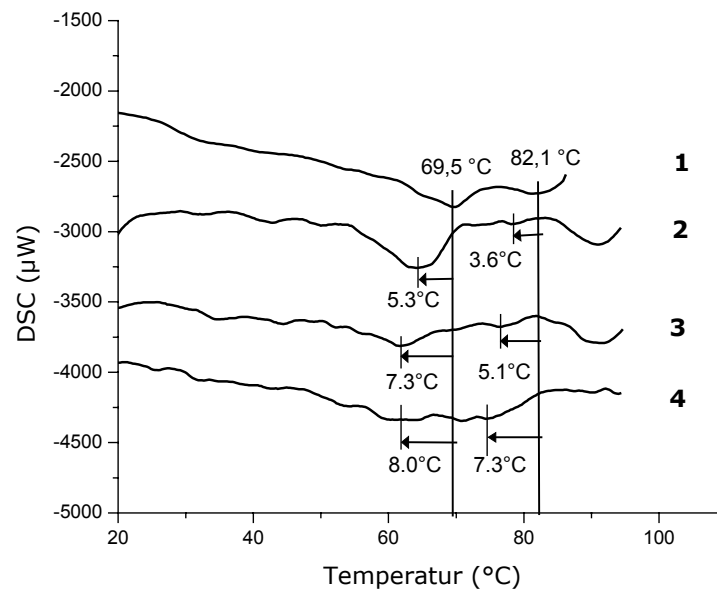


Abb. 4.23: DSC-Thermogramme von Stratum corneum behandelt mit Ø (1), WHS (2), Basiscreme (3), Thermogel (4), alle  $n = 1$ ; Hautspende weiblich (48 Jahre alt, Bauch)



Tabelle 4.4: Verschiebungen der Phasenumwandlungstemperaturen T2 und T3 von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung mit verschiedenen Grundlagen. Die Anzahl der Mehrfachmessungen ist angegeben (sd = Standardabweichung).

Stratum corneum behandelt mit	T2 [°C]	T3 [°C]	T2 sd [°C]	T3 sd [°C]
Ø (n = 5)	68,5	78,7	± 1,0	± 0,69
WHS (n = 3)	- 1,4	+ 0,6	± 0,50	± 0,60
Basiscreme (n = 3)	- 2,0	- 0,2	± 0,38	± 0,56
Dolgit® Mikrogel (n = 3)	- 4,1	- 3,3	± 0,46	± 0,52
Thermogel (n = 4)	- 4,6	- 4,3	± 0,38	± 0,38

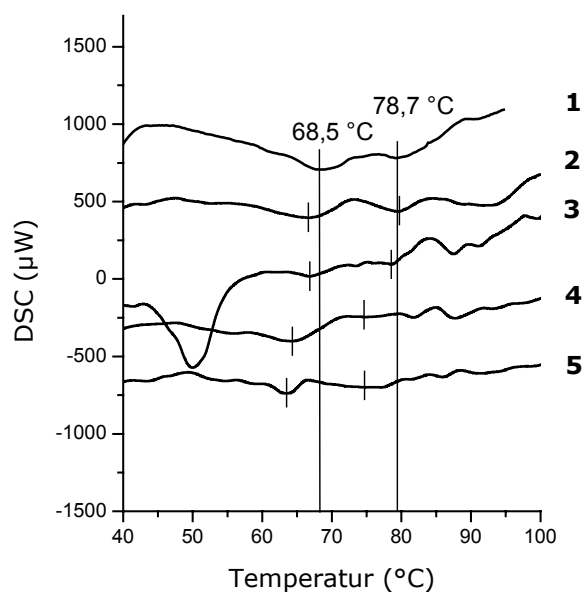


Abb. 4.24: DSC-Thermogramme von Stratum corneum (n = 5) behandelt mit Ø (1), WHS (2), Basiscreme (3), Dolgit® Mikrogel (4), Thermogel (5), alle n = 3; Thermogel n = 4, Hautspende weiblich (57 Jahre alt, Bauch)

#### **4.4.2 Thermogravimetrie**

Anhand der Thermogravimetrie wurden die flüchtigen Anteile des Thermogels bestimmt. Als flüchtige Komponenten der Zubereitung sind das Wasser mit einem Massenanteil von 50,0 % und Isopropylalkohol mit einem Massenanteil von 12,5 % zu erwarten. In der Summe ist somit ein maximaler Verlust von 62,5 % (m/m) an Bestandteilen realistisch. Die Messungen bestätigten diese Annahme, da 62,8 % ( $\pm 0,141$ ,  $n = 2$ ) der eingewogenen Masse im Laufe des Versuches verloren gingen.

### **4.5 Thermogel-Variationen**

#### **4.5.1 Zusammensetzung**

Die im Zuge der Permeationsuntersuchungen offensichtlich gewordene Überlegenheit des Thermogels gegenüber herkömmlichen Arzneibuchgrundlagen und dem Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel in Bezug auf die Permeationsförderung von 5-ALA durch das Stratum corneum, wirft die Frage nach den dafür verantwortlichen Komponenten auf. Um den Einfluss der einzelnen Komponenten oder auch eventuelle synergistische Effekte zu untersuchen, wurde als Basisformulierung ein 20 %iges Poloxamergel gewählt. In dieses Basisgel wurden sowohl einzelne Komponenten, als auch Kombinationen der Inhaltsstoffe der Gesamtkomposition des Thermogels eingearbeitet. Das Verhältnis von Poloxamer zu Wasser wurde stets bei 1:4 belassen, um in jedem System das gleiche Verhältnis von Gelbildner und Wasser zu gewährleisten. Diese Zubereitungen wurden dann zur Permeation von 5-ALA durch SC eingesetzt. Tabelle 4.5 gibt eine Aufstellung über die Zusammensetzung der Thermogel-Variationen. Im fortlaufenden Text werden die jeweiligen Systeme mit ihren verkürzten Bezeichnungen aufgeführt. Mit Pox wird das 20 %ige Poloxamer-Grundgel bezeichnet, PoxDIM repräsentiert z.B. die 3er Kombination von DMIS, MCT und IPA im Poloxamer-Grundgel, PoxI enthält als einzige Komponente neben Poloxamer IPA, während PoxM neben Poloxamer und Wasser nur mittelkettige Triglyzeride enthält.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung von Thermogel und seinen Variationen

Komponente [g/100g]	Thermogel	PoxDIM	PoxDI	PoxI	PoxD	PoxM	Pox
Poloxamer	20,0	14,0	15,0	17,5	17,5	19,0	20,0
IPA	12,5	12,5	12,5	12,5	-	-	-
DMIS	12,5	12,5	12,5	-	12,5	-	-
MCT	5,0	5,0	-	-	-	5,0	-
Wasser	50,0	56,0	60,0	70,0	70,0	76,0	80,0

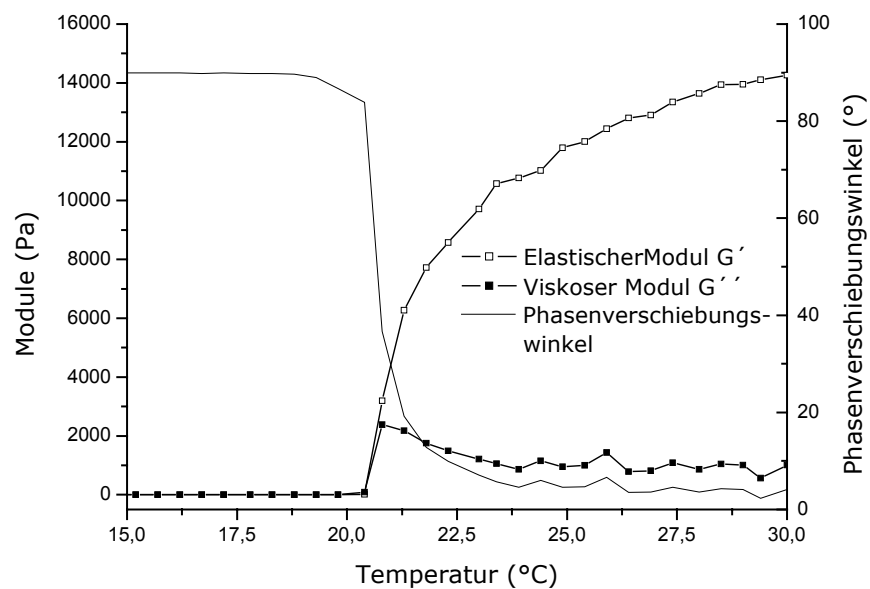
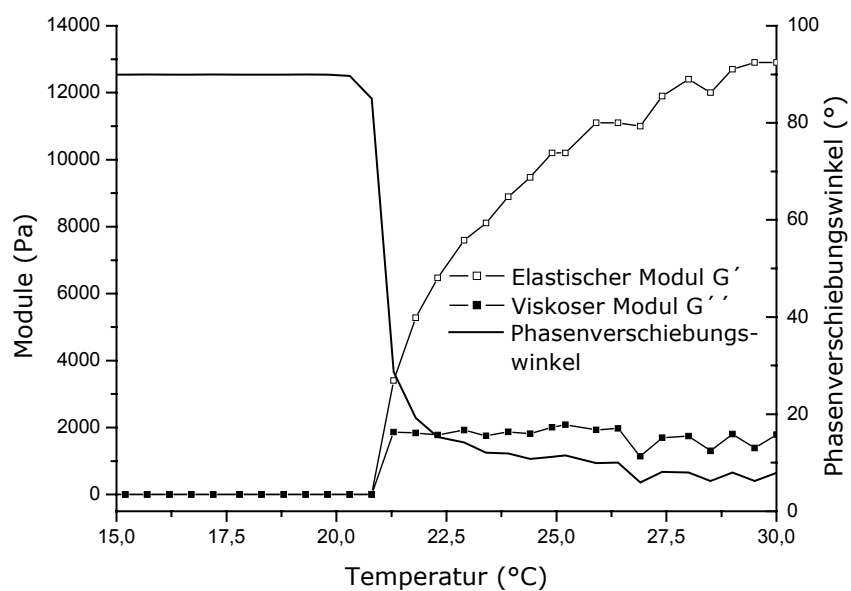
Unmittelbar nach der Herstellung mit dem Unguator® zeigten die einzelnen Systeme verschiedene Konsistenzen. Lediglich Pox und PoxM wiesen halbfesten Charakter bei Raumtemperatur auf, während die anderen Zubereitungen flüssig blieben. Dieser Befund spielt für die dermale Applikation eine wichtige Rolle, da zur effektiven Penetration des Arzneistoffes eine ausreichend lange Kontaktzeit des Vehikels mit der Haut sichergestellt sein muss. Fließt die Zubereitung von der Haut, ist diese essentielle Voraussetzung natürlich nicht gegeben, da nicht genügend Arzneistoff in tiefere Hautschichten penetrieren kann.

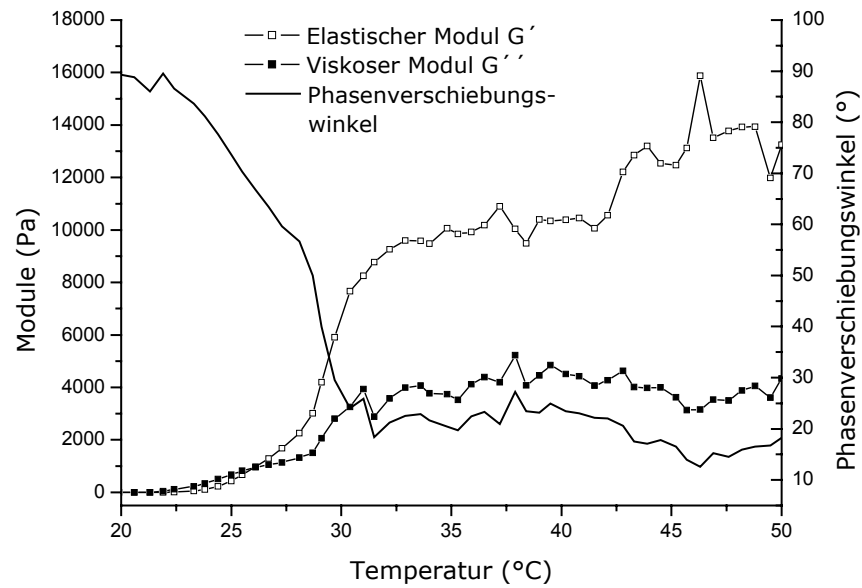
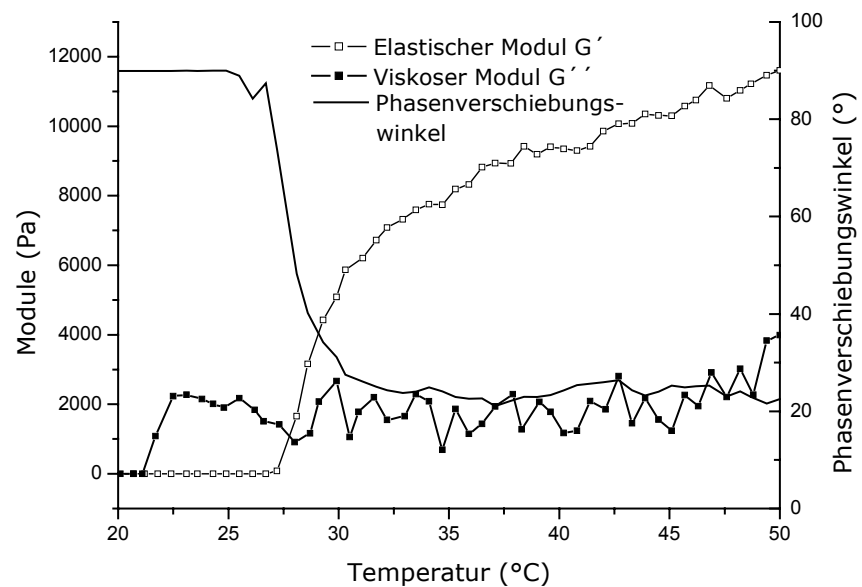
#### 4.5.2 Bestimmung des Gel-Punktes der Thermogel-Variationen

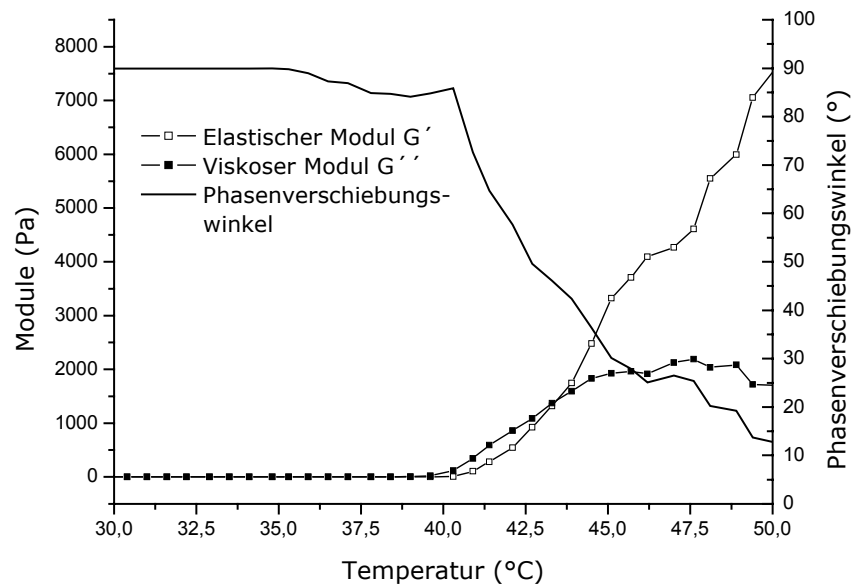
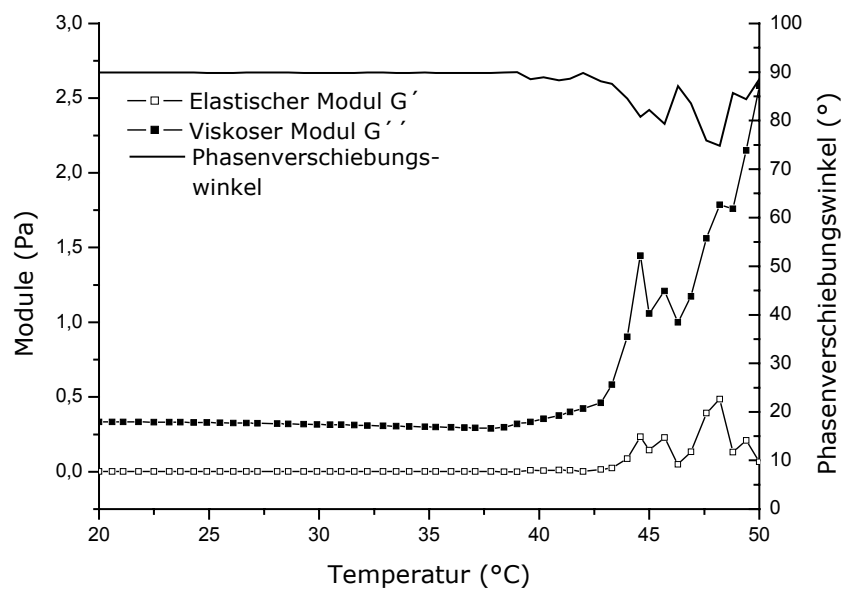
Um den Gel-Punkt der bei Raumtemperatur flüssigen Zubereitungen zu bestimmen, wurden Temperatursweeps durchgeführt. Abb. 4.25 und Abb. 4.26 lassen erkennen, dass eine gewisse Mindestmenge an Poloxamer im System enthalten sein muss, damit es unter 25 °C zur Gelierung kommt. Je höher der Anteil an Poloxamer im System ist, desto früher kommt es zur Gelierung. Charrueau et al. [2001] erkannten ebenfalls die Abhängigkeit des Sol/Gel-Überganges von der Poloxamerkonzentration. Analog dazu ist auffällig, dass tendenziell der Gel-Punkt der untersuchten Thermogel-Variationen umso höher liegt, je mehr Additiva dem Poloxamergrundgel beigefügt werden. Der Gel-Punkt liegt für PoxM bei 20,8 °C und für Pox bei 21,3 °C (jeweils n = 2). Abb. 4.27 zeigt den Temperatursweep von PoxI, dessen Gel-Punkt bei 26,1 °C liegt.

Weiterhin scheint das System eine weitere Umwandlung bei ca. 41,5 °C zu durchlaufen, da  $G'$  dort einen weiteren deutlichen Anstieg aufweist, und der Phasenverschiebungswinkel sowie  $G''$  sich analog verringern. PoxD beginnt bei 27,7 °C zu gelieren (Abb. 4.28). Für PoxDIM findet der Sol/Gel-Übergang bei 43,9 °C statt. Bei Ende der Messung und einer Temperatur von 50,0 °C befindet sich der elastische Modul allerdings noch im Anstieg (s. Abb. 4.29). Das deutet darauf hin, dass der Geliervorgang noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Allerdings liegt der Phasenverschiebungswinkel bei dieser Temperatur nur noch bei kurz über 12°, womit angenommen werden kann, dass  $G'$  unmittelbar vor dem Erreichen seines Maximums steht, und damit der Übergang vom Sol zum Gel vollzogen ist. Halten sich  $G'$  und  $G''$  die Waage, liegt der Phasenverschiebungswinkel üblicherweise bei 45°. Wenn ein System idealviskos ist, liegt dieser bei 90°, während ein idealelastisches System einen Phasenverschiebungswinkel von 0° aufweist [Rose und Daniels, 1999]. Überraschend ist der direkte Vergleich mit Thermogel, da sich PoxDIM nur im Poloxamer- und Wassergehalt von ihm unterscheidet, und damit das System ist, das dem Thermogel in seiner Zusammensetzung am ähnlichsten ist. Thermogels elastische Anteile überwiegen ab einer Temperatur von 12,7 °C, PoxDIM zeigt dieses Verhalten ab 43,9 °C. Als weiteres flüssiges System stellt sich PoxDI vor, dessen viskoser Modul über den gesamten Temperaturmessbereich über  $G'$  dominiert (Abb. 4.30) und das nicht zur Gelierung gebracht werden konnte.

Mit PoxM und Pox existieren zwei Systeme, die bei Raumtemperatur als Gel applizierbar sind, während PoxI und PoxD zwar zunächst flüssig sind, aber bei Hautkontakt gelieren würden. PoxDIM und PoxDI verbleiben flüssig, könnten aber durchaus als sprühbare Applikationsform in Betracht gezogen werden. PoxD wäre allerdings ein geeigneterer Kandidat für diese Applikationsform als PoxDIM, da ersteres bei Hautkontakt geliert. Inwiefern sich diese Zubereitungen als „Drug Delivery Systems“ für 5-ALA eignen, sollen Permeationsuntersuchungen aufdecken.

Abb. 4.25: Temperatursweep von PoxM,  $n = 2$ Abb. 4.26: Temperatursweep von Pox,  $n = 2$

Abb. 4.27: Temperatursweep von PoxI,  $n = 2$ Abb. 4.28: Temperatursweep von PoxD,  $n = 2$

Abb. 4.29: Temperaturesweep von PoxDIM,  $n = 2$ Abb. 4.30: Temperaturesweep von PoxDI,  $n = 2$

### 4.5.3 Permeation von 5-ALA aus Thermogel und Thermogel-Variationen

Vor Beginn der Permeationsuntersuchungen wurden die verwendeten Stratum corneum-Stücke makroskopisch auf Unversehrtheit überprüft. Da keines perforiert war, sollte es dem Arzneistoff nicht möglich sein, das Stratum corneum ungehindert durch ein Loch zu überwinden. Auch die Behaarung war gleich stark ausgeprägt, so dass eventuelle Unterschiede im Permeationsverhalten nicht auf eine verstärkte Permeation entlang der Haarfollikel zurückgeführt werden können.

Abb. 4.31 spiegelt die Permeationsprofile für 5-ALA aus Thermogel und den getesteten Thermogel-Variationen wider. Es wird deutlich, dass für 5-ALA aus allen Zubereitungen eine Verzögerungszeit, eine Lag-Zeit, besteht, nach der detektierbare Mengen an Arzneistoff das Stratum corneum passieren. Sie wird durch Extrapolation des ersten linearen Kurvenabschnittes mit der Abszisse bestimmt. Diese Lag-Phase ist typisch für Permeationsvorgänge durch die Hornhautbarriere, da in dieser Aufsättigungsphase der Arzneistoff in das Stratum corneum penetriert und sich darin anreichert. Bis zu einer Versuchsdauer von 500 min unterscheiden sich die Zubereitungen bzgl. ihrer 5-ALA-Permeation nicht signifikant; die permeierte 5-ALA-Menge schwankt innerhalb der Standardabweichungen. Pox als das Poloxamer-Basisgel weist zwar mit 255 min eine relativ kurze Lag-Zeit auf, offenbart mit  $7,07 \cdot 10^{-10} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$  über den gesamten Versuchszeitraum aber den geringsten 5-ALA-Flux aller Zubereitungen. Dies ist nicht verwunderlich, da keine der potenziell permeationsfördernden Substanzen des Thermogels darin enthalten ist. Auf deutlich höherem Level verlaufen die Permeationskurven für das Basisgel mit zusätzlich einem weiteren Bestandteil. Beim Probenzug nach insgesamt 660 min ist die Lag-Phase für 5-ALA aus allen Zubereitungen überwunden. Pox und PoxD sind die einzigen Vehikel, aus denen 5-ALA bereits zu diesem Zeitpunkt einen gleichmäßigen Flux aufweist. Nach einer kurzen Lag-Zeit von 112 min können aus PoxD bereits sehr geringe Mengen an 5-ALA im Akzeptormedium detektiert werden. Diese Mengen sind allerdings so gering, dass kein Anfangsflux daraus bestimmt wird. Abb. 4.31 zeigt, dass die Permeationskurve dieser Zubereitung schon nach 480 min beginnt, linear zu verlaufen, und damit der Flux von  $2,35 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$  ( $\pm$



$1,46 \cdot 10^{-9}$ ) von diesem Zeitpunkt an bestimmt werden kann. Generell ähneln sich die Permeationskurven für 5-ALA aus den Zubereitungen PoxI, PoxM, PoxDI und PoxD. Gewisse Unterschiede ergeben sich allerdings in Hinsicht auf die Lag-Zeit, und auch bezüglich des Verlaufes der Permeationskurven. Präzise betrachtet, weisen die Graphen für PoxM, PoxDI und PoxI zwei deutliche Anstiege der Kurve auf. Aufgrund dessen wird nach Überwinden der Lag-Zeit sowohl ein Anfangs-Flux, als auch ein End-Flux beginnend nach ca. 800 min Versuchsdauer berechnet. Der End-Flux ist stets höher und wird auch in der vergleichenden Übersicht von Abb. 4.32 herangezogen, da jenseits von 800 min Versuchsdauer alle Zubereitungen einen konstanten Flux für 5-ALA aufweisen.

Die 5-ALA Permeation aus PoxM und PoxDI verläuft nahezu identisch. Dies zeigen sowohl die Kurvenverläufe als auch die Flux- und Permeationskoeffizient-Berechnungen (s. Tabelle 4.6). Die Permeationsdaten ergeben fast identische Werte für den End-Flux von PoxD und PoxI, was die Permeationskurve auch widerspiegelt. Abb. 4.31 zeigt, dass die Permeationskurven von PoxD und PoxI erst jenseits von 1440 min parallel verlaufen. Dadurch, dass 5-ALA aus PoxD eine so geringe Lag-Phase zeigt, endet die Permeationskurve allerdings auf vergleichsweise höherem Niveau als die Permeationskurve von PoxI, da diese Zubereitung im Anfangsbereich des Experimentes einen sehr viel geringeren Flux für 5-ALA aufweist. Auch im Vergleich zu PoxM und PoxDI endet PoxD auf einem höheren Niveau, obwohl jene gegen Ende des Experimentes einen höheren Permeationskoeffizienten für 5-ALA offenbaren (s. Tabelle 4.6 und Abb. 4.31). Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese beiden Zubereitungen eine größere Lag-Zeit als PoxD haben (PoxM = 585 min, PoxDI 500 min, PoxD = 112 min). Nach Überwindung dieser Phase starten sie zunächst mit einem um den Faktor 3,19 (PoxM) und 3,57 (PoxDI) geringeren Anfangs-Flux im Vergleich zu PoxD, vermögen gegen Ende des Experimentes 5-ALA aber mit einem nochmals ansteigenden, höheren Flux als für 5-ALA aus PoxD durch die Hornhautbarriere zu befördern. Dadurch, dass die 5-ALA-Permeation aus PoxD schon so früh begonnen hat, kann die permeierte 5-ALA-Menge aus PoxDI und PoxM trotz des deutlich höheren End-Fluxes (Faktor 1,93 für PoxM, Faktor 2,23 für PoxDI) bis zum Ende des Permeationsexperimentes nicht mehr aufgeholt werden. Dies macht deutlich, wie wichtig die Beachtung der sogenannten Lag-Zeit neben den Permeationsdaten J und P ist.

Als Zwischenfazit kann festgehalten werden, dass die Anwesenheit mittelkettiger Triglyzeride die Permeation annähernd so effektiv zu fördern vermag wie die binäre Kombination von DMIS und IPA im Basisgel. Gegenüber PoxM zeigt PoxDI nur eine leichte Verbesserung der 5-ALA-Permeation. Der berechnete Wert für PoxDI ( $4,66 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ ) (s. Abb. 4.32) liegt nur geringfügig unter dem durch die Permeationsstudien erhaltenen „realen“ Flux mit  $5,24 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$  innerhalb der Standardabweichung. Der berechnete Flux für das binäre System PoxDI wurde erhalten, indem die Summe der realen, durch Permeationsuntersuchungen bestimmten, Flux-Daten der Systeme PoxD und PoxI gebildet wurde. Dieser theoretisch aus der Summe der realen Flux-Werte zu erwartende Wert wurde dann mit dem real anhand der Permeationsuntersuchungen bestimmten Flux für 5-ALA aus PoxDI verglichen. Analog wurde der berechnete Flux des ternären Systems PoxDIM aus den realen Flux-Daten für 5-ALA aus PoxD, PoxI und PoxM berechnet.

Betrachtet man hingegen die ternäre Kombination aus DMIS, MCT und IPA im Basisgel, zeigt PoxDIM einen um den Faktor 1,37 gesteigerten Flux im Vergleich zum Thermogel, und einen um den Faktor 2,62 höheren Wert als PoxM. Es ist die einzige untersuchte Zubereitung, die eine Verbesserung der 5-ALA-Permeation im Vergleich zu Thermogel bewirkt. Zieht man den aus PoxI, PoxM und PoxD errechneten Flux J heran, erhält man mit  $9,19 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$  einen Wert, der dem realen, gemessenen Flux für Thermogel entspricht ( $8,71 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ ). Der reale Flux dieser ternären Kombination beträgt hingegen  $1,19 \cdot 10^{-8} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ , was einer Steigerung gegenüber dem berechneten Wert um fast 30 % entspricht.

Damit wird gezeigt, dass nicht nur jede Komponente zur Permeationsförderung beiträgt, sondern auch noch ein Synergismus der Komponenten besteht. Die Permeationsförderung geht über die rein additiven Effekte der Einzelkomponenten hinaus, selbst unter Einbeziehung der Standardabweichungen. Die deutlich erhöhten Werte für Flux und Permeationskoeffizient von 5-ALA aus PoxDIM im Vergleich zu Thermogel sind vermutlich auf die geringere Viskosität des Vehikels zurückzuführen. Die Viskosität einer Formulierung beeinflusst in jedem Fall die Freisetzung bzw. Diffusion eines Arzneistoffes. Ricci et al. [2002] berichten, dass höher viskose Gele Lidocain langsamer freisetzen als weniger viskose. Es kann also sein, dass durch die Anwesenheit von MCT, IPA und DMIS in beiden Formulierungen

(PoxDIM und Thermogel) die Mikrostruktur des Stratum corneum in gleichem Maße verändert wird, so dass es extrem permeabler für den Arzneistoff wird. Plötzlich ist nicht mehr das Stratum corneum der limitierende Faktor, der die Arzneistoffpermeation bremst, sondern die Grundlage, aus der der Arzneistoff nicht mehr schnell genug nachdiffundiert. Davon ausgehend, dass die Veränderung des Stratum corneum durch Thermogel und PoxDIM gleichermaßen stattgefunden hat, wird natürlich aus einer geringer viskosen Zubereitung ein höherer Flux für 5-ALA gemessen werden können, da aufgrund eines höheren Diffusionskoeffizienten die Freisetzung daraus schneller erfolgt [Bauer et al., 1999].

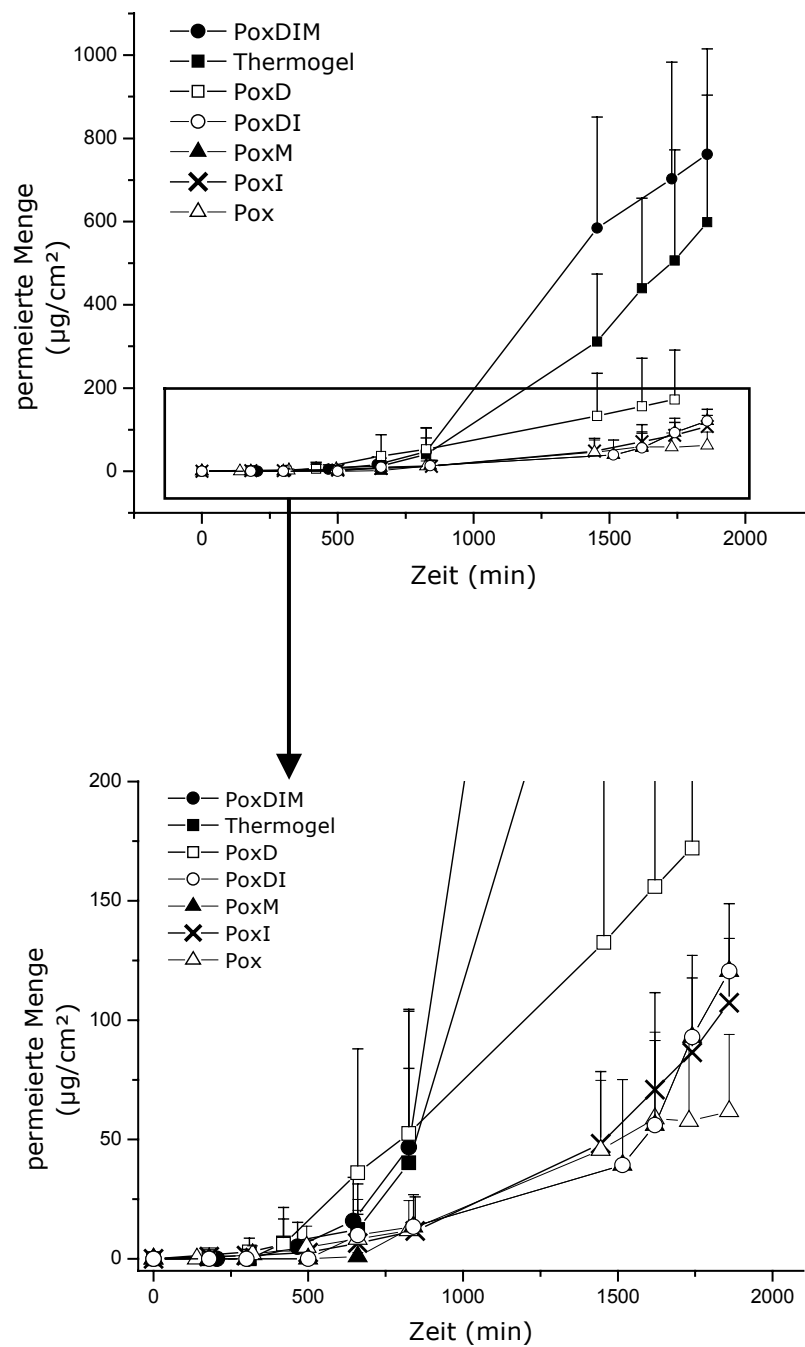


Abb. 4.31: Permeation von 5-ALA 10 % (m/m) aus Thermogel-Variationen (n = 4), PoxM (n = 3), vergrößerter Ausschnitt (unten), Hautspende weiblich (46 Jahre alt, Bauch)

Tabelle 4.6: Vergleich der Permeationsdaten für 5-ALA aus Thermogel und Thermogel-Variationen

Donor mit 5 - ALA, 10 % (m/m)	Flux J [g/cm <sup>2</sup> ·s]	Flux J [g/cm <sup>2</sup> ·s]	Permeations koeffizient P [cm/s]	Permeations koeffizient P [cm/s]	Quotient: <i>Zubereitung</i> <i>Thermogel</i>		Lag- Zeit [min]
	Anfang	Ende	Anfang	Ende	J Ende	P Ende	
PoxDIM (n = 4)	$1,19 \cdot 10^{-8}$ $\pm 3,32 \cdot 10^{-9}$		$1,13 \cdot 10^{-7}$ $\pm 3,17 \cdot 10^{-8}$		1,37	1,24	436
Thermogel (n = 5)	$8,71 \cdot 10^{-9}$ $\pm 4,04 \cdot 10^{-9}$		$9,13 \cdot 10^{-8}$ $\pm 4,23 \cdot 10^{-8}$		1	1	350
PoxDI (n = 5)	$6,58 \cdot 10^{-10}$ $\pm 4,01 \cdot 10^{-10}$	$5,24 \cdot 10^{-9}$ $\pm 8,95 \cdot 10^{-10}$	$6,27 \cdot 10^{-9}$ $\pm 3,82 \cdot 10^{-9}$	$4,99 \cdot 10^{-8}$ $\pm 8,52 \cdot 10^{-9}$	0,60	0,55	500
PoxM (n = 3)	$7,36 \cdot 10^{-10}$ $\pm 5,05 \cdot 10^{-10}$	$4,53 \cdot 10^{-9}$ $\pm 1,23 \cdot 10^{-9}$	$7,22 \cdot 10^{-9}$ $\pm 4,95 \cdot 10^{-9}$	$4,45 \cdot 10^{-8}$ $\pm 1,21 \cdot 10^{-8}$	0,52	0,49	585
PoxD (n = 4)	$2,35 \cdot 10^{-9}$ $\pm 1,46 \cdot 10^{-9}$		$1,97 \cdot 10^{-8}$ $\pm 1,23 \cdot 10^{-8}$		0,27	0,22	112
PoxI (n = 4)	$3,62 \cdot 10^{-10}$ $\pm 1,65 \cdot 10^{-11}$	$2,31 \cdot 10^{-9}$ $\pm 6,64 \cdot 10^{-10}$	$3,66 \cdot 10^{-9}$ $\pm 1,67 \cdot 10^{-10}$	$2,33 \cdot 10^{-8}$ $\pm 6,71 \cdot 10^{-9}$	0,27	0,26	241
Pox (n = 4)	$7,07 \cdot 10^{-10}$ $\pm 2,87 \cdot 10^{-10}$		$7,21 \cdot 10^{-9}$ $\pm 2,93 \cdot 10^{-9}$		0,08	0,08	255

Eine Verbesserung der Permeation aus den verschiedenen Thermogel-Variationen im Vergleich zum Thermogel kann durch Quotientenbildung aus Flux bzw. Permeationskoeffizient der jeweiligen Formulierung und Thermogel erkannt werden. Manche Zubereitungen wie PoxDI, PoxM und PoxI weisen deutlich zwei Anstiege in den Permeationskurven für 5-ALA auf. Da der Flux von 5-ALA aus diesen Zubereitungen zu Beginn des Experimentes, also unmittelbar nach Überwinden der Lag-Phase, sehr gering ist, werden zur Berechnung des Quotienten die Flux-Daten herangezogen, die in der zweiten Hälfte der Permeationsexperimente erhalten werden. Man kann davon ausgehen, dass zu diesem Zeitpunkt optimale Bedingungen für die Permeation herrschen. Durch den andauernden Kontakt des Stratum corneum mit der jeweiligen Grundlage ist die Haut gequollen. Wasser vermag die Korneozyten effektiv quellen zu lassen, wodurch der hydrophile Arzneistoff schneller das Stratum corneum durchdringen

kann. Ferner haben eventuelle Penetrationsenhancer ihre Wirkung entfaltet und das SC fluidisiert, ergo durchlässiger für 5-ALA gemacht. Der Arzneistoff hat seine optimale Route durch die SC-Struktur gefunden. Es ist daher sinnvoll, die Kurvenabschnitte zu fortgeschrittenerem Zeitpunkt der Permeation zu vergleichen, sobald ein gleichmäßiger 5-ALA-Flux aus allen Zubereitungen besteht.

Abb. 4.32 zeigt anschaulich, dass die einzelnen Komponenten des Thermogels eine Permeationsverbesserung bewirken, wenn sie kombiniert werden. Die Flux-Daten der binären und ternären Systeme sind stets höher als die berechneten. Addiert man die Flux-Daten für PoxD und PoxI, so erhält man einen Wert von  $4,66 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ . Der gemessene Wert für PoxDI liegt hingegen bei  $5,24 \cdot 10^{-9} \text{ g/cm}^2 \cdot \text{s}$ , und ist also um 12 % höher als der errechnete. Die Steigerung des Fluxes fällt beim binären System allerdings viel geringer aus als beim ternären System PoxDIM. Daher kann festgehalten werden, dass nicht nur jede Komponente zur Permeationsförderung beiträgt, sondern sogar ein Synergismus der Substanzen besteht. Die Permeationsförderung für 5-ALA geht über die rein additiven Effekte der Einzelkomponenten hinaus, selbst wenn man die addierte Standardabweichung beider Systeme einbezieht.

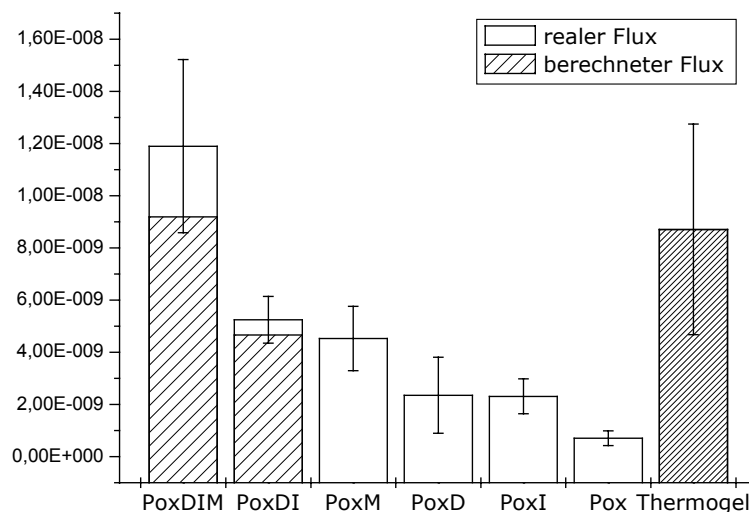


Abb. 4.32: End-Flux J [ $\text{g/cm}^2 \cdot \text{s}$ ] für 5-ALA aus den Thermogel-Variationen im Vergleich zu Thermogel mit einem Poloxamer zu Wasser Verhältnis von 1:4

#### 4.5.4 DSC-Messungen

DSC-Messungen an Stratum corneum sollten zeigen, inwiefern das Thermogel und seine Variationen Lipide des Stratum corneum beeinflussen und dadurch die Permeabilität für 5-ALA erhöhen. In Kapitel 4.4.1 wurde gezeigt, dass Thermogel eine erhebliche Verschiebung der Phasenübergänge zu geringeren Temperaturen verursacht, was mit einer erhöhten Permeabilität der Hornhautbarriere korreliert werden kann. Im vorliegenden Kapitel wird dargestellt, wie die jeweiligen Zusätze zum Thermogel die Phasenübergangstemperaturen des Stratum corneum beeinflussen. Neben den Thermogel-Variationen werden auch wässrige Zubereitungen (Kombination aus MCT, IPA, DMIS in Wasser), sowie die reinen Thermogel-Komponenten bezüglich ihrer Wirkung auf Stratum corneum untersucht.

Mit Tabelle 4.7 ist eine Übersicht erstellt, die die Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung der verschiedenen Formulierungen zeigt. Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen von weniger als 3 °C werden als nicht signifikant betrachtet. Dies gilt für Pox (20 %iges Poloxamergel), reines DMIS, eine 10 %ige 5-ALA-Lösung, sowie Wasser. Auch MCT in reiner Form rangiert in diesem Bereich und geht mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen konform, die für lipophile Vehikel wie die mittelkettigen Capryl-/Caprinsäure-Triglyzeride keine signifikanten Verschiebungen der Lipid-Phasenübergangstemperaturen berichten können [Babita et al., 2006]. Abb. 4.36 a und b verdeutlichen anschaulich, dass PoxDI, gefolgt von PoxDIM und Thermogel die stärksten Verschiebungen der Temperatur verursachen, bei der es zur Schmelze der lamellar angeordneten Lipide kommt (T<sub>2</sub>). Die Verschiebungen von T<sub>2</sub> durch PoxD und PoxI sind mit -3,4 °C und -3,0 °C nicht signifikant. Für PoxM tritt mit einer Verschiebung von 4,3 °C zu geringeren Temperaturen ein ähnlich starker Einfluss wie beim Thermogel auf, allerdings fehlen hier Mehrfachmessungen.

Den größten Einfluss haben hingegen die kombinierten Komponenten in Wasser. Sie führen zu einer stärkeren Verschiebung von T<sub>2</sub> als die entsprechende Kombination im Poloxamer-Basisgel. Dies lässt den Schluss zu, dass der höhere Wassergehalt gepaart mit der maximalen Zahl an Komponenten des Thermogels die Barriere des Stratum corneum optimal durchlässiger macht (s. Abb. 4.33,

Abb. 4.34). Tabelle 4.7 zeigt, dass sich die wässrige Kombination von IPA und DMIS gleichermaßen auf T2 (-7,2 °C) und T3 (-7,8 °C) auswirkt, während die Dreierkombination einen stärkeren Einfluss auf T2 (-8,0 °C) zeigt als auf T3 (-5,8 °C). Diese Systeme wurden nicht bei Permeationsuntersuchungen eingesetzt, da sie lediglich den Wassereinfluss auf das Stratum corneum untermauern sollten. Die intensivste Veränderung des Stratum corneum aller untersuchten Zubereitungen verursacht allerdings purer IPA, denn der Phasenübergang von T2 verschwindet völlig.

Der Phasenübergang der Protein assoziierten Lipide vom Gel zum Sol (T3) wird ebenfalls am stärksten durch IPA (-8,9 °C), gefolgt von den wässrigen Systemen, beeinflusst. PoxDIM (-7,1 °C), Thermogel (-6,7 °C) und PoxDI (-6,3 °C) unterscheiden sich deutlich von den Basisgel-Formulierungen mit nur einer Komponente. Sie haben einen großen Einfluss auf die Lipide, ihre Werte unterscheiden sich aber nur wenig (s. Tabelle 4.7).

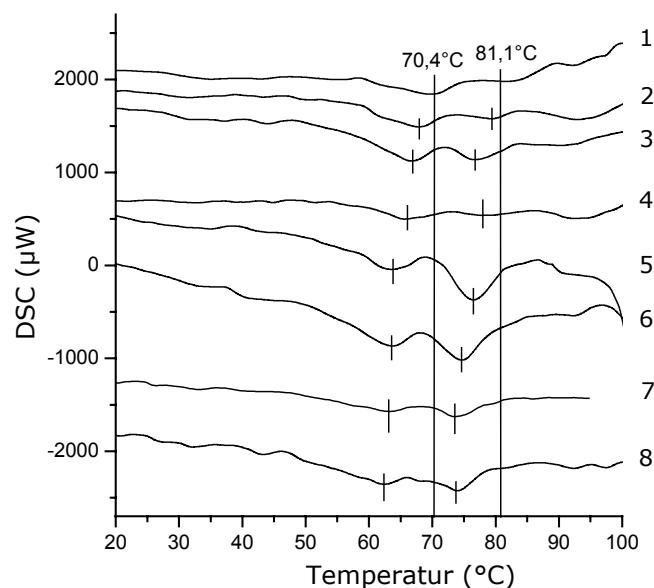


Abb. 4.33: DSC-Thermogramme von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung mit Thermogel und Thermogel-Variationen; reines SC (1), Pox (2), PoxD (3), PoxM (4), PoxI (5), PoxDI (6), Thermogel (7), PoxDIM (8); Hautspende weiblich (46 Jahre alt, Bauch)



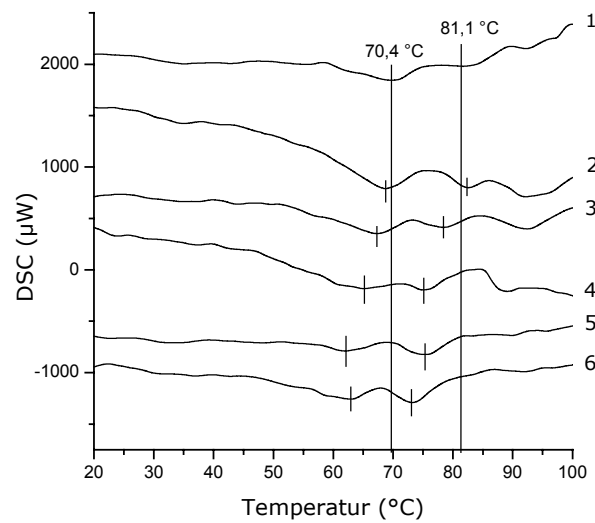


Abb. 4.34: DSC-Thermogramme von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung mit Ø (1), 5-ALA 10,0 % + 90,0 % Wasser (2), Wasser (3), Thermogel (4), IPA/DMIS je 12,5 % + MCT 5,0 % + Wasser 70,0 % (5), IPA/DMIS je 12,5 % + Wasser 75,0 % (6); Hautspende weiblich (46 Jahre alt, Bauch)

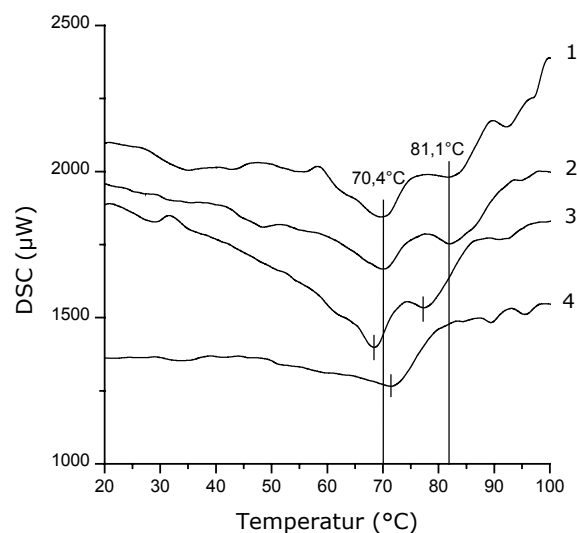


Abb. 4.35: DSC-Thermogramme von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung mit Ø (1), mit MCT (2), mit DMIS (3), mit IPA (4); Hautspende weiblich (46 Jahre alt, Bauch)

Tabelle 4.7: Verschiebungen der Phasenübergangstemperaturen von exzidiertem humanen Stratum corneum nach Behandlung mit verschiedenen Komponenten bzw. Formulierungen. Im Falle von Mehrfachmessungen ist die Anzahl der Messungen angegeben (Standardfehler < 0.05); sd = Standardabweichung)

Stratum corneum behandelt mit	T2 [°C]	T3 [°C]	T2 sd [°C]	T3 sd [°C]
Ø (n = 4)	70,4	81,1	± 1,19	± 1,29
MCT	+ 1,5	+ 1,0		
ALA 10,0 % + 90,0 % Wasser	- 1,3	+ 1,5		
Pox (n = 3)	-1,9	- 2,5	± 0,44	± 0,42
DMIS	- 2,0	- 3,5		
Wasser	- 2,8	- 2,6		
PoxD	- 3,4	- 4,1		
PoxM	- 4,3	- 2,8		
PoxI (n = 3)	- 3,0	- 5,4	± 1,24	± 1,11
Thermogel (n = 3)	- 4,2	- 6,7	± 0,72	± 0,38
PoxDIM (n = 2)	- 5,7	- 7,1	± 0,99	± 0,78
PoxDI (n = 2)	- 7,2	- 6,3	± 0,71	± 0,21
IPA/DMIS je 12,5 %, MCT 5,0 % + Wasser 70,0 %	- 8,0	- 5,8		
IPA/DMIS je 12,5 %, Wasser 75,0 %	- 7,2	- 7,8		
IPA (99,0 %)	-	- 8,9		± 0,78

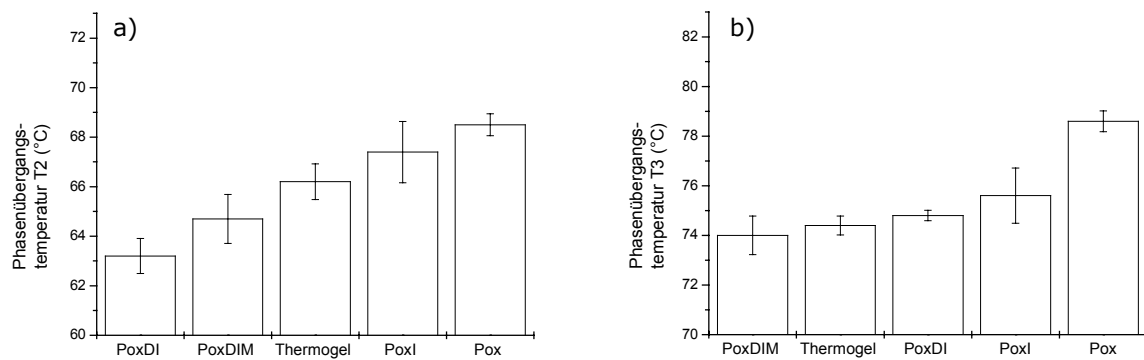


Abb. 4.36 **a**: Phasenübergangstemperatur T2 nach Behandlung von Stratum corneum mit verschiedenen Grundlagen, **b**: Phasenübergangstemperatur T3 nach Behandlung von Stratum corneum mit verschiedenen Grundlagen

#### **4.5.5 Penetrationsenhancer des Thermogels**

Auf welche Weise die einzelnen Komponenten des Thermogel wirken könnten, soll dieses Kapitel beleuchten. Thermogel enthält mehrere, potentiell die Penetration verbessernde Stoffe. Wasser stellt die anteilmäßig am stärksten vertretene Komponente dar. Es ist allgemein als permeationsfördernder Stoff anerkannt und vermag die Bilayer-Region der Lipide zu fluidisieren. Die Wassermoleküle sind über Wasserstoffbrückenbindungen mit den polaren Kopfgruppen der Lipide assoziiert und bilden so eine hydrophile Hülle. Die Folge ist eine weniger dichte Anordnung der Moleküle im Bereich der Bilayer und eine Reduzierung intermolekularer Anziehungskräfte, wodurch Arzneistoffen eine Migration erleichtert wird. DSC-Messungen stützen dies insofern, als Wasser die Phasenübergangstemperaturen von T<sub>2</sub> und T<sub>3</sub> verringert [Barry, 1987], (s. auch Kapitel 2.5.6).

Des Weiteren sind Alkohole dafür bekannt, dass sie große Mengen an SC Lipiden extrahieren können und die Anzahl an freien Sulfhydryl-Gruppen des Keratins erhöhen. Eine Folge ist die erhöhte Permeation von hydrophilen Substanzen [Sinha und Kaur, 2000], zu denen auch 5-ALA zählt. Für Ethanol ist ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf T<sub>2</sub> und T<sub>3</sub> bekannt; je höher der Volumenanteil, desto stärker die Verschiebungen zu geringeren Temperaturen [Babita et al., 2006]. Eine Erhöhung des Volumenanteils über 70 % (v/v) vermindert allerdings die Permeation von Arzneistoffen, was mit einer übermäßigen Dehydratisierung des Stratum corneum und einer damit einhergehenden Verstärkung der Rigidität der Bilayer erklärt wird [Babita et al., 2006], die die Permeation von Arzneistoffen behindert. IPA vermag hingegen die Lipide zu extrahieren, da der Übergang von T<sub>2</sub> nach Einwirkung auf das SC völlig verschwunden ist. Die Protein-assoziierten Lipide, die der T<sub>3</sub>-Umwandlung zugeschrieben werden, können durch IPA offensichtlich nicht vollständig extrahiert werden, werden allerdings stark fluidisiert, was sich anhand der starken Verschiebung bemerkbar macht.

MCT spielt im Thermogel ebenfalls eine Rolle als Enhancer. Sinha et al. beschreiben MCT und Fettsäuren u.a. als Substanzen, die dazu beitragen, die Arzneistoffsolubilisierung in einem Vehikel zu verbessern und die Barriere des SC zu zerstören [Sinha et al., 2000]. Dieser Einfluss hingegen spielt im Thermogel

nur in eingeschränktem Maße eine Rolle, da MCT nur mit einem Massenanteil von 5 % (m/m) vertreten ist, und eine Solubilisierung der polaren 5-ALA aufgrund der ausgeprägten Hydrophilie nicht nötig ist. Hier ist eher die Eigenschaft von MCT-Molekülen von Belang, durch Einlagerung zwischen die lipophilen Bereiche der Bilayer-Strukturen eine Aufweitung zu bewirken und damit die Permeabilität des Stratum corneum für 5-ALA zu erhöhen.

DMIS fungiert normalerweise als (Co)Solvens. Es ist in der Literatur bisher nicht als permeationsfördernde Substanz beschrieben. Aboofazeli et al. [2002] setzten es allerdings in einer ternären Kombination mit Propylenglykol und Ölsäure als Vehikel zur Permeation von Nicardipin durch Maushaut ein, was einen beträchtlich höheren Flux bewirkte als nur die Kombination von Ölsäure und Propylenglykol allein. Außerdem konnte keines der einzelnen Lösungsmittel die Permeation von Nicardipin verbessern. In Bezug auf das Thermogel gesehen, fällt die Wirkung von DMIS als alleiniger Zusatz nicht ins Gewicht. Nicardipin ist ein sehr lipophiler Stoff mit einem logP von 5,51 [Tang und Mayersohn, 2006] und durch DMIS als Cosolvens wurde höchstwahrscheinlich seine Löslichkeit im Vehikel erhöht. 5-ALA ist ein sehr hydrophiler Stoff mit einem logP von -1,51 und würde sich auch ohne DMIS-Zusatz vollständig im Thermogel lösen. Somit dürfte DMIS keine Rolle bei einer – nicht erforderlichen- Löslichkeitsverbesserung von 5-ALA im Vehikel spielen. Allerdings kann es, falls es neben dem Arzneistoff ebenfalls in das SC penetriert, dort die Löslichkeit von 5-ALA in lipophileren Regionen des Interzellularraumes erhöhen und damit deren schnellere Passage unterstützen.

Inkorporiert in das Thermogel und in Zusammenhang mit dessen oberflächenaktiven Eigenschaften trägt jede Komponente des Thermogels zur Permeationsförderung von 5-ALA bei. Jeder Bestandteil ist somit unverzichtbar für die Gesamt-Komposition des Thermogels, was sowohl die Permeationsuntersuchungen als auch die DSC-Messungen verdeutlichen.

## **4.6 Röntgenweitwinkelmessungen**

### **4.6.1 an exzidiertem humanen Stratum corneum**

Röntgenografische Methoden geben Informationen über den Ordnungszustand der untersuchten Zubereitungen. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der WAXD-Messungen mit der Debeye-Scherrer-Kamera von unbehandeltem Stratum corneum, von mit Thermogel behandeltem, sowie mit Thermogel-Variationen behandeltem Stratum corneum vorgestellt.

Wie schon unter 2.5.4 beschrieben, zeigen Röntgenweitwinkeluntersuchungen an humanem Stratum corneum zwei scharfe Reflexe bei ca. 0,414 und 0,372 nm und zwei diffuse Banden bei ungefähr 0,460 und 0,980 nm [Bouwstra et al., 1992, 2001, Cornwell et al., 1994, Garson et al., 1991]. Das für die vorliegenden Experimente verwendete Stratum corneum zeigte zwei scharfe Banden bei 0,415 und 0,375 nm (Abb. 4.37), die in der Literatur beschriebenen diffusen Banden waren nicht erkennbar. Nach Behandlung mit Thermogel trat neben zwei scharfen Interferenzen bei 0,412 und 0,373 nm noch eine weitere bei 0,457 nm auf. Dieser Befund lässt zwar eine tendenzielle Verringerung der charakteristischen Nahordnungsabstände für die kristallinen Lipidbilayerstrukturen des Interzellularraumes in orthorhombischer Anordnung erkennen, allerdings relativieren die Standardabweichungen die Signifikanz dieser Messergebnisse. Eindeutig festgestellt werden kann nur, dass das Thermogel in Interaktion mit den Stratum corneum Lipiden tritt. Die zusätzliche Interferenz bei 0,457 nm entspricht dem in der Literatur berichteten diffusen Signal von 0,460 nm, das dem Korneozyten-Keratin zugeordnet wird [Bouwstra, 1992, Garson et al., 1991]. Winkler [2005] berichtet ebenfalls vom Auftreten dieser Interferenz nach Behandlung von SC mit Dolgit® Mikrogel. Dass dieses Signal beim unbehandelten SC nicht auftritt, könnte auf eine nicht ausreichende Empfindlichkeit der Methode hindeuten. Die Strukturen sind nicht ausgeprägt genug, als dass sie detektiert werden können. Das Thermogel hingegen organisiert diese Keratin-Strukturen in einer Weise, dass sie in einer Ordnung vorliegen, die unter den gewählten Messbedingungen einen scharfen Reflex bewirkt. Die gleichen Beobachtungen gelten für mit PoxDIM behandeltes SC. Es treten ebenfalls drei Interferenzen auf, die alle etwas höher als beim Thermogel, jedoch innerhalb der Standardabweichungen liegen.

PoxD behandeltes SC wies Interferenzen bei 0,375 und 0,410 nm auf. Da es nur zu einer Verringerung des letztgenannten Abstandes gekommen ist, liegt ein alleiniger Einfluss auf die locker angeordneten Gelphasenlipide in hexagonaler Ausrichtung nahe, da die Interferenz von 0,414 nm charakteristisch für sie ist [Cornwell et al., 1994, Bouwstra et al., 2002, Pilgram et al., 1999, Small et al., 1988]. Wäre die orthorhombische Anordnung beeinflusst worden, müsste der Reflex bei 0,375 nm verschoben sein.

Ein überraschender Effekt trat nach Inkubation von SC mit PoxI auf. Die Interferenz bei 0,375 nm war völlig verschwunden, während sich der Nahordnungsabstand von 0,415 nm auf 0,410 nm verringert hat. Diese Kombination hat zu einem Ordnungsverlust der Stratum corneum Lipide geführt, da nur ein erhalten gebliebener Reflex auf eine regelmäßige Struktur hinweist. Fehlt die Interferenz, ist das ein Hinweis auf eine verloren gegangene Ordnung.

Nach Behandlung des SC mit PoxDI blieben die Interferenzen für die hexagonale und orthorhombische Anordnung der Lipidketten unverändert. Dieser Befund lässt sich nicht mit den guten Permeationseigenschaften dieses Vehikels für 5-ALA korrelieren.

PoxM bewirkte eine Aufweitung des Abstandes für die orthorhombische Formation der Lipide von 0,375 auf 0,378 nm, was allerdings auch als statistische Schwankung zu werten ist (s. Werte für PoxDIM), während die hexagonale Ausrichtung mit einem Abstand von 0,414 nm unbeeinflusst blieb.

Das Poloxamergrundgel führte zur deutlichsten Veränderung der orthorhombischen Anordnung der Lipidalkylketten aller untersuchten Zubereitungen mit einem Nahordnungsabstand von 0,383 nm. Während Winkler [2005] eine ähnlich starke Aufweitung mit dem interkalierenden Einbau des Wirkstoffes Ibuprofen in die Lipiddoppelschicht des Stratum corneum erklärte, ist diese Erklärung nicht auf die vorliegenden Messungen zu übertragen. Die Mehrfachmessungen offenbarten erhebliche statistische Schwankungen, weswegen eine starke Aufweitung mit Vorsicht zu interpretieren ist. Die zweite Interferenz bei 0,411 nm war vergleichbar mit der von unbehandeltem SC und zeigte somit keine Veränderung.

Zusammenfassend gesehen sind nur auswertbare Effekte nach Behandlung von SC mit Thermogel und PoxDIM zu verzeichnen, was sich im Auftreten einer zusätzlichen Interferenz bemerkbar macht. Ferner verschwindet eine Interferenz nach Einwirken von PoxI auf das SC. Alle anderen Interferenzen sind aufgrund hoher Standardabweichungen nicht in Hinblick auf eine etwaige Beeinflussung durch die jeweilige Zubereitung zu interpretieren.

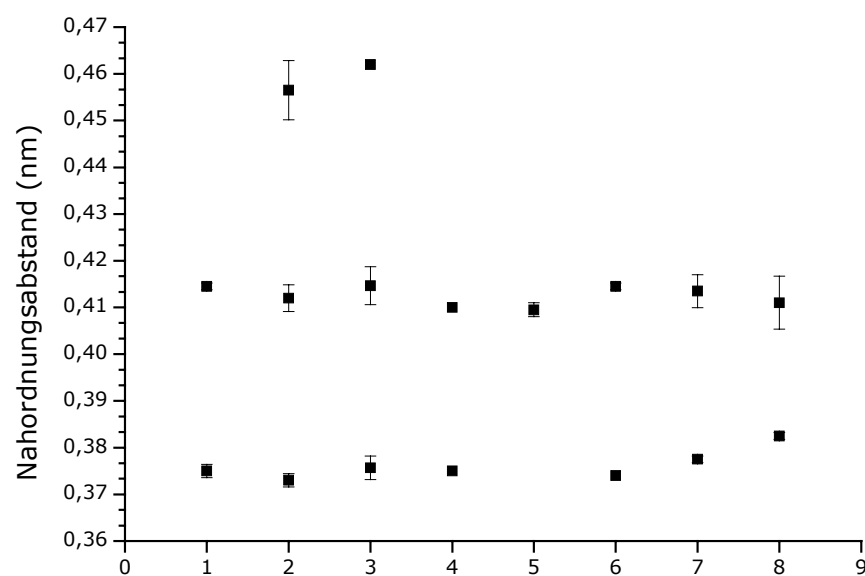


Abb. 4.37: Röntgeninterferenzen für unbehandeltes Stratum corneum (1), behandelt mit Thermogel (2), mit PoxDIM (3), mit PoxD (4), mit PoxI (5), mit PoxDI (6), mit PoxM (7), mit Pox (8); jeweils  $n = 2$



#### 4.6.2 an Probiol®

Da die WAXD-Messungen mit der Debeye-Scherrer-Kamera an Stratum corneum zu hohe statistische Schwankungen ergaben und damit keine aussagekräftigen Interpretationen möglich waren, sollte mit Probiol® als ein dem Stratum corneum ähnelnden Modell weiter gearbeitet werden. Anstelle der Debeye-Scherrer-Kamera mit manueller Ausmessung der Interferenzringe wurde nun ein Goniometer mit Spinner und automatischer Peak-Erkennung eingesetzt. Dabei rotierte der Probenhalter permanent zur Erhöhung der Intensität der Signale und Reduzierung von Vorzugsorientierungen. Der gleiche Versuchsaufbau war auch für die Vermessung von Stratum corneum verwendet worden, hatte sich allerdings aus verschiedenen Gründen nicht bewährt. Zunächst gestaltete es sich als schwierig, das Stratum corneum auf dem Probenhalter zu positionieren. Nach Behandlung mit den halbfesten Zubereitungen lag es nicht mehr in seiner trockenen, pergamentartigen Struktur vor, sondern war deutlich hydratisiert und zog sich stark zusammen. Da es aber für ausgeprägte Reflexe faltenfrei mit glatter Oberfläche auf dem Probenhalter positioniert werden musste, war diese Messeinrichtung offensichtlich nicht geeignet. Folglich waren keine Peaks erkennbar, die über das Grundrauschen hinausgingen. Ferner ist eine gewisse Mindestmenge an Probesubstanz nötig, um deutliche Reflexe zu erhalten, denn die Peakgröße eines Reflexes korreliert unmittelbar mit der Masse der Probe. Dies stellte eine weitere Limitierung der Messung mit dem Goniometer dar, denn das Stratum corneum stand bekanntlich nur in begrenzter Menge zur Verfügung. Selbst Messungen, bei denen behandeltes SC mit einigen Lagen unbehandeltem und gut stapelbarem SC unterlegt wurden, erbrachten keine auswertbaren Peaks. Aufgrund dieser Problematik wurden die Messungen an SC Material sparend mit der Debeye-Scherrer-Kamera durchgeführt.

Da Probiol® in seiner Zusammensetzung den Lipiden des humanen Stratum corneum sehr ähnlich ist, sollte es pur und in Kombination mit den verschiedenen Thermogel-Komponenten untersucht werden. Dabei sollten eventuelle Effekte auf die Lipide erkannt werden. Bei Probiol® handelt es sich um eine liposomale halbfeste Zubereitung, deren Zusammensetzung an der Komposition der Lipide der menschlichen Haut orientiert ist. Sie wird in erster Linie zur Hautpflege als Kosmetikum eingesetzt und basiert auf DMS®, einer Derma-Membran-Struktur.

In DMS<sup>®</sup> vereinen Membran-Lipide anstelle von Emulgatoren die Öl- und Wasserphase. Die Schlüsselsubstanz dieser Zubereitung ist hochreines Lecithin, das in lamellarer Struktur angeordnet ist. Die positive Wirkung auf die Haut liegt neben einer möglichen Permeationsförderung in der Zunahme der Langzeithautfeuchte bei optimaler Hautverträglichkeit, da auf jegliche Emulgatoren, Duftstoffe, Konservierungsmittel, Mineralöle und Farbstoffe verzichtet wird [Kuks GmbH, 2007]. Des Weiteren war DMS<sup>®</sup> in Kombination mit 2 % 6-Ketocholestanol schon Grundlage für 5-ALA-Permeationsuntersuchungen durch Schweinehaut. Dabei wurde vorrangig die 5-ALA-Stabilität untersucht, jedoch kein Permeationskoeffizient ermittelt [Auner et al., 2004].

Abb. 4.38 zeigt das Diffraktogramm von Probiol<sup>®</sup> mit einer kleinen Schulter im Kleinwinkelbereich, in der bei  $2\theta = 3,18^\circ$  und  $2\theta = 5,17^\circ$  zwei Peaks erkannt werden, was Netzebenenabständen von 2,78 nm und 1,71 nm entspricht. Des Weiteren erscheint ein ausgeprägter Reflex in der Weitwinkelregion bei  $2\theta$  (Theta) =  $21,53^\circ$ . Dies entspricht einem Netzebenenabstand von 0,413 nm und wird der hexagonalen Packung der Alkylketten der Lipide zugeordnet, die innerhalb dieses Verbandes einigermaßen frei rotieren können. Das Signal bei  $5,17^\circ$   $2\theta$  (1,71 nm) wird durch Cholesterol verursacht [Bouwstra et al., 1992].

Der Reflex bei  $3,18^\circ$   $2\theta$ , entsprechend 2,78 nm, kann keiner Struktur eindeutig zugeordnet werden. Gemäß Bouwstra et al. [1992] zeigt humanes Stratum corneum Arrangements zweier lamellarer Strukturen mit Netzebenenabständen von 6,4 und 13,4 nm. Basierend auf der Struktur mit einem Netzebenenabstand von 13,4 nm, wird rechnerisch ein Abstand von 2,68 nm einem Reflex 5. Ordnung der lamellaren Phase zugeschrieben. Die Diskrepanz zwischen dem bei Probiol<sup>®</sup> gemessenen Reflex und dem rechnerisch nach Bouwstra ermittelten ist allerdings viel zu groß, als dass man ihn mit Sicherheit einem Reflex 5. Ordnung einer lamellaren Phase zuordnen könnte.

Die verschiedenen Mischungen der Thermogel-Variationen mit dem Probiol<sup>®</sup> verändern das Reflexmuster von Probiol<sup>®</sup> kaum. Der scharfe Reflex bei  $2\theta = 21,53^\circ$  bleibt jeweils bestehen und schwankt in seiner Lage zwischen  $21,55^\circ$  und  $21,42^\circ$ , was Netzebenenabständen von 0,412 bis 0,415 nm entspricht. In Tabelle 4.8 sind die Röntgeninterferenzen der verschiedenen Mischungen zusammengefasst. Neben dieser charakteristischen in allen Mischungen

nachweisbaren Probiol<sup>®</sup>-Interferenz, treten lediglich bei den Mischungen mit PoxDIM und PoxM zwei weitere Signale auf, wobei es zu einer Reduzierung des für Cholesterol charakteristischen Reflexes entsprechend einem Netzebenenabstand von 1,71 nm auf Werte um 1,66 nm kommt. Der charakteristische Reflex für die hexagonale Anordnung der Lipidalkylketten, entsprechend einem Netzebenenabstand von 0,413 nm, wird, wie in jeder anderen Probe auch, detektiert, allerdings weist er keine Änderung auf.

Aus Tabelle 4.8 wird deutlich, dass die meisten Zubereitungen nur ein oder zwei Signale aufweisen. Die Mischung aus Probiol<sup>®</sup> 70 % + IPA 30 % ergibt z.B. neben dem Cholesterol-Peak nur noch das Signal für die hexagonal angeordneten Lipidketten, während bei der Mischung aus Probiol<sup>®</sup> 70 % + MCT 30 % der Cholesterol-Peak nicht mehr auffindbar ist. Leider lässt sich im Auftauchen oder Verschwinden der Signale kein systematischer Zusammenhang erkennen. Bei der Hälfte der Zubereitungen geht die Fernordnung der lamellaren Struktur verloren, indem das Signal bei ca.  $3,18^\circ 2\theta$  verschwindet. Da sich die zugehörige Schulter bei kleinen Beugungswinkeln bei einigen Zubereitungen leicht verändert, könnte das ein Hinweis auf Änderungen in der Fernordnung sein. Röntgenkleinwinkelmessungen, die den Bereich kleiner Winkel besser auflösen, könnten eventuell Auskunft darüber geben.

In Abb. 4.38 und Abb. 4.39 sind die Röntgendiffraktogramme von Probiol<sup>®</sup> und Probiol<sup>®</sup> gemischt mit MCT aufgezeigt. Diese Mischung weist die größten Veränderungen hinsichtlich der Lage und Ausprägung der Reflexe im Vergleich zu reinem Probiol<sup>®</sup> auf und ist daher exemplarisch mit aufgeführt. Im Bereich kurz unter  $2\theta = 20^\circ$  bildet sich eine weitere Schulter heraus, die umso ausgeprägter ist, je höher der MCT-Anteil in der Probenmischung ist.

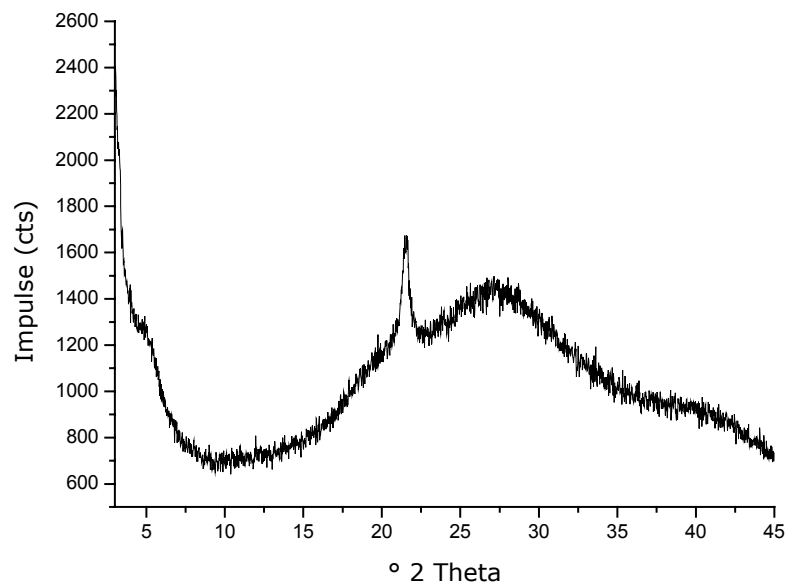


Abb. 4.38: Röntgendiffraktogramm von Probiol<sup>®</sup>, n = 1

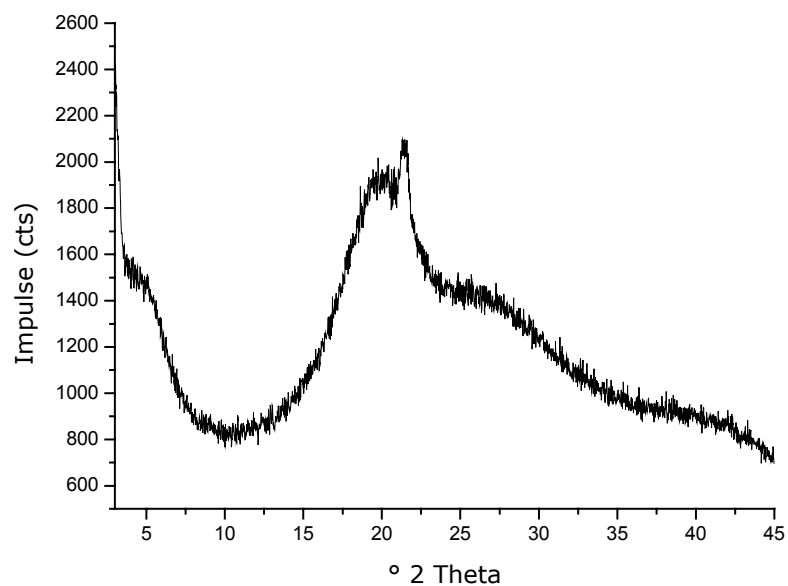


Abb. 4.39: Röntgendiffraktogramm von Probiol<sup>®</sup> 70 % + MCT 30 %, n = 1

Tabelle 4.8: Röntgeninterferenzen für Probiol® und Mischungen mit Thermogel, Thermogel-Variationen und ausgewählten Komponenten, n = 1

Zubereitung	Netzebenenabstand [nm]		
Probiol®	2,78	1,71	0,413
Probiol® 70% + PoxDIM 30 %	2,80	1,67	0,413
Probiol® 70 % + PoxM 30 %	2,81	1,66	0,414
Probiol® 70 % + Thermogel 30 %		1,66	0,412
Probiol® 70 %+ PoxDI 30 %	2,82		0,415
Probiol® 70 % + PoxI 30 %		1,67	0,414
Probiol® 70 % + MCT 30 %	2,85		0,415
Probiol® 70 % + PoxD 30 %			0,412
Probiol® 70 % + Pox			0,414
Probiol® 70 % + IPA 30 %			0,414

#### 4.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Röntgenweitwinkeluntersuchungen

Die Röntgenexperimente an Probiol® müssen weiter optimiert werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen. Die Tatsache, dass bei manchen Mischungen einige Signale gar nicht mehr detektiert wurden, kann natürlich einerseits auf einen Ordnungsverlust hindeuten, andererseits könnte aber auch die Empfindlichkeit des Gerätes zu gering sein. Für aussagekräftige Ergebnisse muss das optimale Verhältnis von Probiol®-Matrix zur Komponente, deren Einfluss untersucht werden soll, gefunden werden. Die zu vermessende Mischung sollte auf der einen Seite gerade noch so viel Matrix enthalten, dass deren charakteristische Reflexe weiter auftreten. Auf der anderen Seite muss der zugemischte Anteil an Probe ausreichend groß sein, damit ein Effekt überhaupt auftritt und über das Grundrauschen hinaus detektiert werden kann. Mit den vorliegenden Ergebnissen ist dieses Stadium noch nicht realisiert, so dass für weiterführende Untersuchungen Potential besteht.

MCT scheint einen Einfluss auf die Lipidanordnung von Probiol® zu haben, der mit steigender Konzentration zunimmt und weiter untersucht werden sollte. Da in erster Linie allerdings der Einfluss des Thermogels interessiert, ist der erwähnte Befund eher von untergeordnetem Interesse.

#### **4.7 Röntgenkleinwinkelmessungen**

Messungen im Kleinwinkelbereich geben Aufschluss über eventuelle Veränderungen im Fernordnungsbereich eines Systems. Die Untersuchungen von Thermogel ließen keine Zuordnung zu einer bestimmten flüssigkristallinen Struktur zu, da die Folgereflexe nach dem Reflex 1. Ordnung fehlten. Die Thermogel-Variationen erzeugten im Kleinwinkelbereich keinerlei Signale. Nach Behandlung von Stratum corneum mit den entsprechenden Zubereitungen traten zwar Veränderungen im Bereich zwischen 0,6 und 1,5 nm<sup>-1</sup> auf, jedoch lagen diese Reflexe an der Grenze der Detektierbarkeit, so dass die Ergebnisse der Messungen nicht weiter zur Charakterisierung der Eigenschaften des Thermogels herangezogen wurden. Die Problematik für die Messungen an Probiol® wurde bereits im vorhergehenden Kapitel erläutert.

#### **4.8 TEM-Untersuchungen**

Weiterführende Informationen über die Struktur des Thermogels konnten leider nicht durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen erhalten werden. Die Bilder deuten darauf hin, dass es bei der Präparation zu einer Kontamination der Probe mit Wasser gekommen war, wodurch System spezifische Strukturen verdeckt werden.

#### **4.9 Neutralrot-Test**

Als charakteristische Größe wird normalerweise mit dem verwendeten Neutralrot-Test als Zytotoxizitätstest der ID<sub>50</sub>-Wert bestimmt, bei dem nur noch die Hälfte der lebenden Zellen im Vergleich zum Blindwert vorhanden ist. Dies gibt die Möglichkeit, die Zytotoxizität verschiedener Substanzen direkt miteinander zu vergleichen. Diese kritische Konzentration wird umso früher erreicht, je toxischer das untersuchte Agens ist. Beim Neutralrot-Test sind nur lebende Zellen in der Lage, den Farbstoff aufzunehmen, dessen Konzentration nach Ende der

Inkubationszeit UV-spektrometrisch bestimmt werden kann [Borenfreund und Puerner, 1985].

Um die Zytotoxizität der Komponenten des Thermogels auf die Zelllinie zu ermitteln, wurden diese in ihrer jeweiligen Konzentration im Thermogel dem Nährmedium zugefügt und auf eine definierte Zellzahl einwirken gelassen. Die präzise Bestimmung der halbletalen Dosis stand hierbei nicht im Vordergrund. Es sollte vielmehr dargestellt werden, in welchem Ausmaße die Komponenten des Thermogels die Zellviabilität beeinflussen.

Der Blindwert stellt eine 100 %ige Überlebensrate dar. Bei seiner Ermittlung wirkte nur das Nährmedium auf die Zellen ein. Aus Abb. 4.40 geht deutlich hervor, dass dieser Wert von 100,0 % ( $n = 8$ ,  $\pm 11,1$  %) nach Einwirkung einer Lösung mit 5 % (m/m) MCT nur geringfügig auf 95,2 % ( $n = 8$ ,  $\pm 10,2$  %) abfällt. MCT hat in dieser geringen Konzentration nicht die Eigenschaft, Zellen nachhaltig in größerem Maße zu zerstören.

Unter Einfluss eines mit 12,5 % (m/m) DMIS angereicherten Nährmediums sind nach der gewählten Inkubationszeit allerdings nur noch 35,7 % ( $n = 8$ ,  $\pm 4,3$  %) der Zellen am Leben. Fügt man dem Medium 5-ALA in 10 %igem Anteil (m/m) hinzu, was einer Stoffmenge von 0,596 mol/l entspricht, überleben dies 28,6 % ( $n = 8$ ,  $\pm 7,6$  %) der Zellen. Winkler [2005] ermittelte eine Zellüberlebensrate von ca. 75 % nach Einwirken einer 0,60 molaren 5-ALA-Lösung. Diese Diskrepanz könnte durch eine unterschiedliche Probenaufgabe verursacht sein. Winkler beobachtete erhebliche Schwankungen der Werte, wenn die Zeitspanne zwischen Absaugen des Nährmediums und dem Auftragen der Testlösungen nicht einheitlich gewählt wurde. Je früher z.B. das 5-ALA-haltige Medium aufgetragen wurde, desto höher war die Neutralrot-Aufnahme und die gemessenen Absorptionen folglich umso höher. War die Befüllung für den ersten Blindwert nach 163 Sekunden abgeschlossen, ermittelte Winkler einen 50 % höheren Wert für die  $ID_{50}$  von 5-ALA als nach einer Zeitspanne von 545 Sekunden [Winkler, 2005]. Dies zog zwar eine Optimierung der Probeaufgabe nach sich, zeigt aber trotzdem, dass geringe Abweichungen bei der Probenaufgabe mit erheblich variierenden Werten einhergehen. Daher sind die Werte der vorliegenden Messungen und die von Winkler schlecht vergleichbar, allerdings können sie jeweils untereinander in Relation gesetzt werden.

Das Thermogel schädigt so stark, dass nur noch 22,4 % ( $n = 7$ ,  $\pm 3,1$  %) der Zellen am Versuchsende leben, was ungefähr in gleichem Maße wie nach Zusatz von 12,5 % (m/m) IPA der Fall ist (18,8 %,  $n = 8$ ,  $\pm 4,3$  %). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die zytotoxischen Eigenschaften des Thermogels in erster Linie vom IPA bestimmt werden. Allerdings ist anzumerken, dass die Überführung des Thermogels in die Well-Einsätze einige Probleme aufwarf, die das Messergebnis ebenfalls beeinflusst haben könnten. Alle Komponenten des Thermogels wurden mit dem flüssigen Nährmedium gemischt und mit einer Pipette in die Wells eingebracht. Das Thermogel selbst mit seiner bei Raumtemperatur halbfesten Konsistenz musste äußerst vorsichtig mit einem Spatel eingebracht werden. Dabei konnten die Zellen natürlich leichter verletzt werden als nach Applikation einer Flüssigkeit. Zusammenfassend gesehen eignet sich dieser Test aufgrund seiner geringen Robustheit also nur bedingt zur Einschätzung der Zytotoxizität des Thermogels.

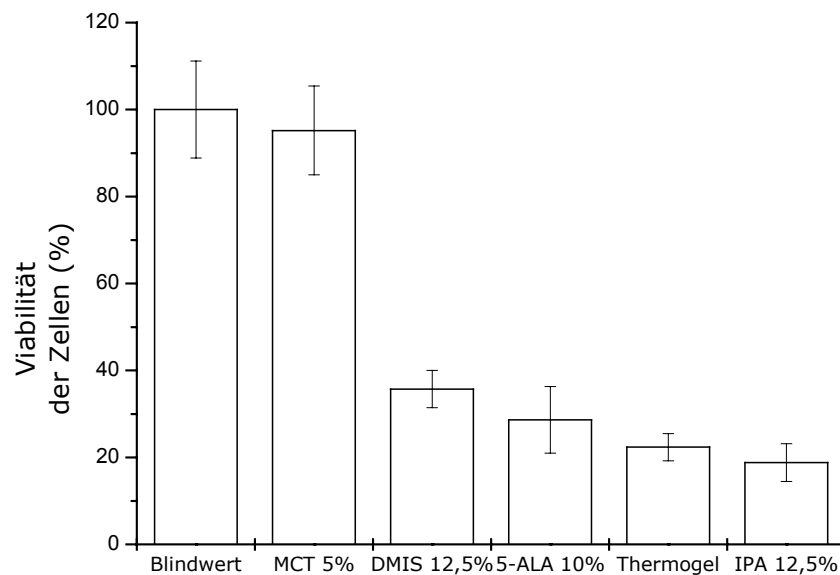


Abb. 4.40: Überlebensrate der Zellen nach Behandlung mit Komponenten des Thermogels,  $n = 2$



## 5 Abschlussdiskussion

Durch Entwicklung eines halbfesten flüssigkristallinen Systems auf Poloxamerbasis sollte die dermale Verfügbarkeit von 5-ALA gesteigert werden. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten, in denen die Steigerung der dermalen Bioverfügbarkeit durch eine Veresterung von 5-ALA zum lipophilen Butylester realisiert wurde, stand in dieser Arbeit die Entwicklung einer geeigneten Formulierung im Vordergrund. Es ist gelungen, mit Thermogel eine Grundlage herzustellen, die die Zielsetzung der Arbeit erfüllt. Zunächst erfolgte eine rheologische Charakterisierung in Hinsicht auf die Festlegung des linear viskoelastischen Bereiches, innerhalb dessen das System ohne Strukturveränderung beansprucht werden konnte. Anschließend wurde das Fließverhalten des Gels untersucht und mit dem der Basiscreme und der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe als ausgewählten Grundlagen des Deutschen Arzneibuches verglichen. Die rheologischen Untersuchungen setzten sich mit der Bestimmung des Gelierpunktes von Thermogel, sowie der Betrachtung des Einflusses diverser Salze darauf fort. *In vitro*-Permeationsstudien mit 5-ALA zeigten, ob die Steigerung der dermalen Bioverfügbarkeit von 5-ALA aus dem neu entwickelten Gel im Vergleich zu den ausgewählten Arzneibuchgrundlagen und zum Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel erfolgreich war. Inwiefern dies durch eine Veränderung in der Mikrostruktur der Hornschicht gelungen war, wurde mit thermo- und röntgenanalytischen Methoden untersucht. Abwandlungen der Komposition des Thermogels wurden ebenfalls Permeationsexperimenten sowie röntgen- und thermoanalytischen Messungen unterzogen. Auf diese Weise sollten ggf. die Komponenten bestimmt werden, die für die Erhöhung der Permeabilität des Stratum corneum verantwortlich waren.

### 5.1 Entwicklung und Charakterisierung des flüssigkristallinen Systems Thermogel

Das neu entwickelte Gel Thermogel ist ein bei Raumtemperatur halbfestes, flüssigkristallines System, das unter dem Polarisationsmikroskop isotrop erscheint. Bei mechanischer Beanspruchung wird es zu Resonanzeffekten im hörbaren Bereich angeregt. Ferner kann es innerhalb weniger Minuten mit geringem technischem Aufwand hergestellt werden: Nach Einwaage der

einzelnen Komponenten in einen apothekenüblichen Unguator<sup>®</sup>, wurden die Komponenten unter hochoberem Rühren zum Gel verarbeitet. Das Thermogel setzt sich aus leicht erhältlichen Grundstoffen wie dem Polymer Poloxamer 407, dem konventionell als Lösungsmittel eingesetzten Isopropylalkohol, mittelkettigen Triglyzeriden, dem Lösungsvermittler Dimethylisosorbid sowie Wasser zusammen. Dass unter Verwendung dieser Substanzen eine Vielzahl verschiedener Systeme mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften entstehen kann, zeigt das pseudoternäre Phasendiagramm (Abb. 4.1) in Kapitel 4.1.2. Diese Übersicht stellt einen Ausschnitt der unzähligen möglichen Formulierungen dar, die nach Variation der Verhältnisse von Poloxamer zu mittelkettigen Triglyzeriden und/oder Isopropylalkohol zu Dimethylisosorbid erhalten werden könnten. Wie aber aus dieser Abbildung ersichtlich ist, und auch empirische Vorversuche zeigten, existieren das Thermogel bzw. halbfeste Systeme nur in einem engen Kompositionsbereich. Wird der Wasseranteil zu groß gewählt, geliert das System nicht, ist der Poloxameranteil zu gering, kann ebenfalls kein Gel erhalten werden. Winkler verwendete zwar die gleichen Inhaltsstoffe, ihm gelangen halbfeste Systeme aber nur unter Zusatz von Ibuprofen [Winkler und Müller-Goymann, 2005]. Für die Praktikabilität in der Photodynamischen Therapie ist ein Gel einer flüssigen Zubereitung vorzuziehen. Damit eine ausreichende Menge an Protoporphyrin IX, dem für die PDT obligaten Photosensibilisator, gebildet werden kann, muss genügend 5-ALA aus der Grundlage in das Stratum corneum diffundieren. Voraussetzung dafür ist eine gewisse Kontaktzeit des Vehikels mit der Haut, die mit einem leicht adhäsiven Gel besser realisiert werden kann als mit einer wässrigen Zubereitung, die leicht von der Haut fließt. In Hinsicht auf die chemische Instabilität der 5-ALA muss die Zubereitung einen leicht sauren pH-Wert aufweisen. Da die Aminosäure in alkalischem Milieu dimerisiert, muss nicht nur auf einen sauren pH-Wert im Puffermedium, sondern auch in der Grundlage geachtet werden [Granick und Mauzerall, 1958, Novo et al., 1996]. Dies wurde über den gesamten Zeitraum der Permeationsuntersuchungen sichergestellt, da sich der pH-Wert in der Zubereitung währenddessen nicht änderte.

Zytotoxizitätstests von Thermogel und seinen Komponenten offenbarten, dass dieser Test nur unzureichend geeignet war, den schädigenden Einfluss halbfester Substanzen zu untersuchen. Da das Thermogel für den Versuch mit einem Spatel

auf die Keratinozyten im 24er Well aufgebracht werden musste, könnten durch eine derartige mechanische Beanspruchung die Zellen mehr verletzt worden sein, als es die eigentliche Anwesenheit des Thermogels verursachen würde. Auch ein Absaugen nach der Inkubationszeit war nicht so einfach möglich wie bei flüssigen Substanzen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Zellen durch die mechanische Entfernung des Thermogels zusätzlich geschädigt wurden. Die Folge war ein Versuchsergebnis, das fälschlicherweise eine zu geringe Zellviabilität ergab, da weniger intakte Zellen zur Verfügung standen, die den Farbstoff aufnehmen konnten. Das unter diesen Bedingungen erhaltene Ergebnis beschreibt das Thermogel mit einer Zytotoxizität, die mit einer Zell-Überlebensrate von 22,4 % zwischen der einer 10,0 %igen 5-ALA-Lösung (28,6 % Überlebensrate) und einer 12,5 %igen IPA-Lösung (18,8 % Überlebensrate) rangiert.

## **5.2 Rheologische Untersuchungen an Thermogel und Variationen**

Anhand der viskosimetrischen Eingangsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich das Thermogel sowohl deutlich von den ausgewählten Arzneibuchgrundlagen, als auch von dem Vorbild Dolgit® Mikrogel unterschieden hat. Die Fließgrenzenbestimmung mit Basiscreme und Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe offenbarte zwei verhältnismäßig früh zum Fließen zu bringende Grundlagen. Anhand der Scherrate nach Erreichen der Fließgrenzen war abzulesen, dass die strukturelle Integrität der Basiscreme größer zu sein schien als die der WHS, da sie bei gleicher Schubspannung um ein Vielfaches weniger stark deformiert wurde als die WHS. Dolgit® Mikrogel war unter den gewählten Versuchsbedingungen ebenfalls ein plastisch fließendes System mit einer doppelt so hohen Fließgrenze wie die Arzneibuchgrundlagen. Im Vergleich zu Thermogel verlor es aber früher seine strukturelle Integrität, was sich anhand einer geringeren Fließgrenze bemerkbar machte. Der stärkere Zusammenhalt des Polymergerüsts beim Thermogel konnte ferner daran abgelesen werden, dass letzteres auf eine Erhöhung der vorgegebenen Schubspannung mit einer vielfach geringeren Scherrate reagierte als Dolgit® Mikrogel. Damit ist in Hinblick auf die rheologischen Voruntersuchungen mit dem Thermogel ein System entstanden,

das einer gewissen mechanischen Beanspruchung, wie z.B. leichten Erschütterungen, standhält.

Oszillationsrheologische Untersuchungen charakterisierten das Thermogel eingehender, da seine viskoelastischen Eigenschaften dadurch beleuchtet werden konnten. Schubspannungsgesteuerte Messungen im Oszillationsmodus unmittelbar nach der Herstellung des Thermogels ergaben eine andere Reaktion der Parameter  $G'$  und  $G''$  als nach einem Tag Lagerzeit. Die Lagerzeit bewirkte, dass das Gel sein Gerüst hinreichend ausbilden und die Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten intensiver ausprägen konnte. Erkennbar war dies zum Einen an der um den Faktor 2,75 geringeren maximalen Deformation bei gleicher Schubspannung. Das Gel ließ sich, nachdem es seine endgültige Struktur ausgebildet hatte, nicht mehr so leicht scheren wie zu einem Zeitpunkt, an dem die Strukturbildung noch nicht abgeschlossen war. Scherte man das System unmittelbar nach der Herstellung, in einem hochtourigen Rührvorgang, verfestigte sich das System bei Rücknahme der Schubspannung. Das Wissen um dieses Phänomen ist wichtig, um dem System eine ausreichende Lagerzeit zur Gerüstbildung zuzubilligen.

Der Zusatz verschiedener Salze als Modells substanzen wirkte sich unterschiedlich auf das Thermogel aus. Der Einfluss der Substanzen hing von ihrem jeweiligen Hydratationsgrad ab, weniger von den kolligativen Eigenschaften. Wurde 5-ALA in Massenanteilen von 1, 5 und 10 % (m/m) eingearbeitet, zeigte jedes Rheogramm einen deutlich unterschiedlichen Verlauf. Die geringste Konzentration an 5-ALA wirkte Struktur verfestigend für das Thermogel, was sich durch eine geringere maximale Deformierbarkeit bemerkbar machte. Dies kann erklärt werden mit dem Hydratationsgrad des Salzes. Umgeben von Wassermolekülen, die sonst die Ethergruppierungen des Poloxamers hydratisieren, können letztere, nun frei vorliegend, untereinander intensiver in Wechselwirkung treten und ein verstärktes Gerüst ausbilden. 5 % 5-ALA führte zur Scherverdünnung des Systems. Die Menge an Arzneistoff war aber noch so gering, dass leicht rheopexes Fließverhalten auftrat. Bei Zurücknahme der Beanspruchung verfestigte sich das System. Mit einem Anteil von 10 % 5-ALA wurde ein kritischer Wert überschritten, bei dem die Anwesenheit vieler Arzneistoff-Moleküle in der Zubereitung zur räumlichen Trennung der Poloxamerketten führte, die schwerer in Kontakt treten konnten, so dass es zu einem verzögerten

Gerüstaufbau kam. Rose berichtete über ein vergleichbares Phänomen im Zusammenhang mit Kochsalz, das zum verzögerten Strukturwiederaufbau bei Wasserhaltiger Hydrophiler Salbe führte [Rose, 1999]. Die Rheogramme nach Kochsalz-Einarbeitung in das Thermogel änderten sich hingegen kaum im Bereich zwischen 1-5 %. Auf- und Abwärtskurve waren deckungsgleich, die Systeme zeigten Pseudoplastizität. Füge man 10 % NaCl hinzu, ergab sich eine Hysteresisfläche zwischen Aufwärts- und Abwärtsdiagramm. Auch hier existierte wie bei 5-ALA eine kritische Konzentration an Salz, die den Wiederaufbau des Gerüstes behinderte. Vergleicht man die Rheogramme des Thermogels mit jeweils zehnpromutigem Massenanteil beider Salze, zeigt sich, dass das 5-ALA-haltige System ca. um den Faktor 2,8 stärker maximal deformiert werden konnte. Das kochsalzhaltige System weist folglich eine etwas höhere Viskosität auf, was auf eine stärkere Hydratation der NaCl-Moleküle zurückgeführt werden kann. Damit sind intensivere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymerketten möglich, und das Gel verfügt über ein ausgeprägteres Netzwerk.

Die Modellschubstanz *p*-Aminobenzoessäure führte ab einem Massenanteil von 4 % (m/m) zur Verflüssigung des Thermogels. Geringer konzentriert floss das System pseudoplastisch und ähnelte dem reinen Thermogel unmittelbar nach dem Herstellvorgang ohne Lagerzeit. Die Fließeigenschaften des Thermogels änderten sich also nach Zugabe verschiedener Salze ab einer gewissen Konzentration, während der pH-Wert in einem Bereich zwischen 2,87 und 6,20 keinen Einfluss auf das Fließverhalten hatte.

Mit Hilfe von Temperatursweeps wurden die Temperaturen der Sol/Gel-Übergänge des Thermogels und seiner Variationen ermittelt. Dies ist von erheblicher Wichtigkeit, da einige bei Raumtemperatur noch flüssige Zubereitungen bei Hauttemperatur gelieren. Damit ändert sich ihr Adhäsionsverhalten, und ihre Verweildauer auf der menschlichen Haut würde sich verlängern. Dies ist Voraussetzung dafür, dass Arzneistoffe in wirksamer Menge aus einer Grundlage durch die Haut diffundieren können.

Der Gelierprozess setzte beim Thermogel mit einer Temperatur von 12,7 °C bei der niedrigsten Temperatur aller untersuchten Zubereitungen ein. Der hohe Anteil an Polymer und ein Maximum an Additiva bedingt diesen relativ niedrigen Gel-Punkt. Die Temperatursweeps zeigen, dass eine gewisse Mindestmenge an

Poloxamer in der Zubereitung enthalten sein musste, damit es zur Gelierung bei Raumtemperatur kam. Die Anwesenheit der weiteren Inhaltsstoffe des Thermogels bewirkte eine Verschiebung des Gel-Punktes zu geringeren Temperaturen im Vergleich zum 20 %igen Poloxamer-Grundgel, das bei 21,3 °C gelierte. Dies konnte mit einer Art Aussalzeffekt begründet werden. Wasser, das über Wasserstoffbrückenbindungen die Ether-Sauerstoffe des Poloxamers hydratisiert, wird durch die Zusatzstoffe gebunden, wodurch die Ether-Valenzen frei werden und nun Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen Poloxamerketten eingehen können. Die Folge ist eine Gelbildung. Die kritische Mindestmenge, die die untersuchten Systeme zur Gelbildung bei Raumtemperatur befähigt, liegt zwischen 17,5 und 19 % (m/m). Da PoxM mit einem Poloxamer-Anteil von 19 % bei 20,8 °C gelierte, PoxI und PoxD (jeweils 17,5 % Poloxamer) hingegen erst bei 26,1 und 27,7 °C, reichte der Einfluss der jeweils zugemischten Komponenten offensichtlich nicht mehr aus, eine Sol/Gel-Übergangstemperatur wie bei PoxM zu bewirken. Das gleiche gilt für PoxDI (15 % Poloxamer), das jenseits des Messbereiches von 50 °C gelierte, und PoxDIM. Qualitativ beinhaltete PoxDIM zwar die gleichen Komponenten wie Thermogel, aber mit 14 % besitzt es den geringsten Poloxamer-Anteil. Noch deutlicher zeigt sich der Aussalzungseffekt nach Einarbeitung von 5-ALA in das Thermogel. Je höher der Massenanteil des Salzes, desto früher setzt die Gelierung ein. Es fungiert folglich als Strukturbildner, wie es auch für  $\text{Cl}^-$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  bekannt ist [Ricci et al., 2002].

### 5.3 *In vitro*-Permeationsstudien

Die Wahl des Vehikels hatte entscheidenden Einfluss auf die Permeation von 5-ALA durch exzidiertes humanes Stratum corneum. Thermogel offenbarte einen immens gesteigerten Permeationskoeffizienten für den Arzneistoff im Vergleich zu den Arzneibuchgrundlagen Basiscreme und Wasserhaltige Hydrophile Salbe. Auch das Fertigarzneimittel Dolgit® Mikrogel rangierte nur in einem Bereich, der dem der Basiscreme entspricht. Dies steht zunächst im Widerspruch zu den Ergebnissen von Winkler, der eine 2,9fache Steigerung des Permeationskoeffizienten für 5-ALA aus Dolgit® Mikrogel gegenüber dem aus Basiscreme zeigte [2005]. An dieser Stelle muss betont werden, dass erhebliche Schwankungen in der Beschaffenheit verschiedener Hautspenden zu stark voneinander abweichenden Permeationsergebnissen führen können. Diesen

Unterschied zeigt der Vergleich der maximal permeierten 5-ALA-Menge aus Dolgit® Mikrogel durch die Hautspende, die Winkler verwendete, mit dem Wert der vorliegenden Arbeit. Durch die von Winkler [2005] eingesetzte Hautprobe permeierten bis zum Versuchsende ca. 40  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , während es durch die Hautprobe der vorliegenden Arbeit nach der gleichen Versuchsdauer ca. 160  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  waren. Diese Differenz an permeierter Arzneistoffmenge kann mit einer unterschiedlichen Beschaffenheit der Hautproben, wie z.B. einem variierenden Gehalt an Lipiden, und damit einer unterschiedlichen Durchlässigkeit erklärt werden. Verwunderlich ist hingegen, dass Winkler eine Steigerung des Permeationskoeffizienten von 5-ALA aus Dolgit® Mikrogel gegenüber dem aus der Basiscreme fand, was die vorliegende Arbeit nicht bestätigen konnte. Hier unterscheiden sich Dolgit® Mikrogel und Basiscreme im Permeationsverhalten für 5-ALA kaum.

Der größte Permeationskoeffizient für 5-ALA wurde aus dem vom Thermogel abgeleiteten System PoxDIM gemessen. Diese flüssige Zubereitung offenbarte ebenfalls die stärksten Interaktionen mit der Mikrostruktur des Stratum corneum, worauf seine erhöhte Permeabilität für 5-ALA zurückgeführt werden konnte. Da es die gleiche Menge an die Löslichkeit verbessernden Substanzen (IPA und DMIS) wie Thermogel enthielt, erleichterte es auf diese Weise die Passage von 5-ALA in lipophilen Bereichen des SC. Ferner kann der gesteigerte Permeationskoeffizient im Vergleich zum Thermogel neben der stärkeren Interaktion mit Stratum corneum-Lipiden mit einer geringeren Viskosität korreliert werden, wodurch der Diffusionskoeffizient für 5-ALA erhöht ist. Die Komplexviskosität betrug bei 30,0 °C für PoxDIM ca. 0,420 Pas, während sie beim Thermogel größer als 4000 Pas war. Dies beeinflusst entscheidend den Diffusionskoeffizienten, da gemäß der Beziehung von Einstein für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten die Viskosität im Nenner miteinbezogen wird. Je höher die Viskosität des Mediums, desto geringer der Diffusionskoeffizient, und desto geringer der Massenstrom pro Zeit gemäß dem 1. Fickschen Gesetz [Bauer et al., 1999]. Der herausstechende Vorteil des Thermogels gegenüber PoxDIM ist aber seine halbfeste Konsistenz, die es neben seinem hohen Potenzial zur Permeationsförderung von 5-ALA als immens geeignetes Vehikel zur dermalen Applikation darstellt. Ferner zeigte der

Arzneistoff mit 350 min aus dem Thermogel eine um 86 min kürzere Lag-Zeit als aus dem flüssigen PoxDIM.

Generell existieren leider nur wenig Abhandlungen in der Literatur, die die 5-ALA-Permeation durch humanes Stratum corneum thematisieren. Meistens wird Schweinehaut oder Maushaut benutzt, die beide nicht direkt mit menschlicher Haut gleich gesetzt werden können. Obwohl Schweinehaut generell als geeignetes Modell im Vergleich zu Humanhaut anerkannt ist [Bouwstra et al., 1995, Schmook et al., 2001], ist zusätzlich das Auftreten erheblicher interindividueller Schwankungen zu beachten. Direkte Vergleiche können also nur zwischen gleichen Hautproben eines Spenders getätigt werden. Ahmadi et al. [2004] befassten sich mit 5-ALA-Permeation in Basalzellkarzinomzellen aus Porphyrin® Creme, allerdings erhoben sie keine Flux-Daten, sondern legten ihr Augenmerk auf die PpIX-Bildung. Ähnliche Versuche machten Peng [2001] und Angell-Petersen et al. [2005], in dem sie die PpIX-Bildung nach topischer Applikation von Metvix® Creme in Basalzellkarzinomen erhoben. Gilmore et al. [2006] erhielten einen Flux für 5-ALA durch porcines Stratum corneum von  $4,5 \cdot 10^{-4}$  mg/cm<sup>2</sup>·s aus Porphyrin® Creme. Dies ist signifikant höher als der Flux aus einem neu von ihnen entworfenen Pflastersystem ( $1,0\text{--}2,0 \cdot 10^{-4}$  mg/cm<sup>2</sup>·s). Im Vergleich dazu erhielten Winkler und Müller-Goymann [2005] einen Flux für den 5-ALA-butylester durch humanes Stratum corneum von  $4,19 \cdot 10^{-6}$  mg/cm<sup>2</sup>·s aus einem Poloxamer enthaltenden Vehikel. Aus dem Thermogel beträgt der Flux für 5-ALA  $8,71 \cdot 10^{-6}$  mg/cm<sup>2</sup>·s und  $1,19 \cdot 10^{-5}$  mg/cm<sup>2</sup>·s aus PoxDIM, und ist damit aus dem Thermogel doppelt so hoch wie der Flux für den leichter durch die Haut permeierenden Butylester.

Prinzipiell ist bei den vorliegenden Permeationsstudien eine besonders kurze Lag-Zeit erwünscht, da auf diese Weise der Arzneistoff schnell am Wirkort in angemessener Menge vorliegt, vorausgesetzt, der Flux ist groß genug. Ist die Lag-Phase sehr lang, macht es wenig Sinn, z.B. 5-ALA in dem entsprechenden Vehikel zu applizieren, da dies die Compliance der Patienten vermindern würde. Die Zubereitung müsste zu lange auf der Haut verweilen, bis ausreichende Mengen an 5-ALA permeiert sind. Allerdings kann angenommen werden, dass die zu behandelnden keratotisch veränderten Hautareale viel durchlässiger sind als gesunde Haut. Boehncke und Kaufmann [1996] berichteten davon, dass in Tumoren die Permeabilität von Gefäßen erhöht ist, was neben einem für



entzündetes Gewebe typischerweise erniedrigten  $pH$ -Wert die Anreicherung des Arzneistoffes begünstigt. Oftmals kann eine kurze Lag-Zeit mit einem erhöhten Flux für einen Arzneistoff durch die Hornhautbarriere korreliert werden, wie es das Thermogel im Vergleich zu den Arzneibuchgrundlagen in Kapitel 4.3 gezeigt hat. Da durch Interaktionen des betreffenden Vehikels mit der Mikrostruktur des Stratum corneum eine erhöhte Permeabilität erreicht worden ist, können dementsprechend nach kürzerer Zeit größere Mengen an Arzneistoff das Stratum corneum passieren. Die Untersuchungen an einer anderen Hautspende mit den Thermogel-Variationen offenbarten als Zubereitungen mit den kürzesten Lag-Zeiten hingegen nicht PoxDIM und Thermogel (die Zubereitungen mit dem höchsten Flux für 5-ALA durch SC), sondern Pox, PoxI und PoxD. Mit 80 % (Pox) und jeweils 70 % (PoxI und PoxD) stellten sie die Zubereitungen mit dem größten Wasseranteil dar. Wasser vermag die Keratinozyten effektiv quellen zu lassen, so dass die hydrophile, transzelluläre Route für den Arzneistoff erleichtert wird. Überraschend ist die hohe Lag-Zeit von PoxM, obwohl dieses System über den zweithöchsten Wasseranteil aller Zubereitungen verfügt. Im Falle von PoxDIM (56 % Wasser) und Thermogel (50 % Wasser) schien der vergleichsweise geringe Wasseranteil nicht auszureichen, das Stratum corneum in der gleichen Weise zu beeinflussen wie die eben genannten Zubereitungen. Ihr permeationsfördernder Effekt ist folglich dem Zusammenspiel der Inhaltstoffe IPA, DMIS und MCT zuzuschreiben. Die Veränderung der Mikrostruktur des SC durch die Dreifach-Kombination benötigte zwar eine gewisse Zeit (Lag-Zeit von PoxDIM beträgt 436 min, von Thermogel 350 min), allerdings geschah dies wesentlich effektiver als bei den anderen Zubereitungen, was der doppelt so hohe Permeationskoeffizient von Thermogel im Vergleich zu PoxDI belegte. Die Permeationsförderung des Thermogels war deshalb so effektiv, da sie an mehreren Stellen des SC stattfand. Wasser ließ in gewissem Maße die Korneozyten quellen, wodurch der intrazelluläre Permeationsweg erleichtert wurde. IPA war sowohl in der Lage, die für die Barriereigenschaften essentiellen Lipide zu extrahieren, als auch die Anzahl der freien Sulfhydrylgruppen des Keratins zu erhöhen, wodurch hydrophilen Substanzen der inter- und intrazelluläre Weg durch das SC erleichtert wurde [Sinha et al., 2000]. MCT lagerte sich als unpolarer Stoff in den lipophilen Bereichen der Bilayer ein und weitete so die enge Packung der Lipide dieser Region auf [Barry, 1987]. Dadurch

konnte der Arzneistoff besser in den Interzellularraum migrieren. Aufgrund der Knappheit der Hautprobe konnte ein Permeationsexperiment mit dem Basisgel, das MCT und IPA enthält, nicht mehr durchgeführt werden. Die Kombination dieser beiden Penetrationsverbesserer lässt rechnerisch einen Flux für 5-ALA erwarten, der bei ca.  $6,8 \cdot 10^{-8}$  g/cm<sup>2</sup>·s, und damit höher als der von PoxDI liegt. Obwohl DMIS kein anerkannter permeationsfördernder Stoff ist, kann auf seine Anwesenheit im Thermogel nicht verzichtet werden. Durch seine Migration in das Stratum corneum kann es die Löslichkeit der hydrophilen 5-ALA in den lipophilen Bereichen des Interzellularraumes erhöhen und ihre Passage erleichtern. Auch IPA allein im Basisgel (PoxI) vermag trotz seiner anerkannten Eigenschaft als Permeationsförderer die Permeation von 5-ALA gegenüber PoxD nicht zu steigern. Miteinander kombiniert, wird dies hingegen erreicht.

#### **5.4 Einfluss der Vehikel auf die Mikrostruktur des Stratum corneum**

Veränderungen in der Mikrostruktur der Lipidmatrix des Stratum corneum gehen mit erhöhter Permeabilität einher [Golden et al., 1987] und können mittels röntgenanalytischer und differenzkalorimetrischer Messungen erkannt werden. Dies äußert sich z.B. anhand einer Verschiebung der Phasenübergangstemperaturen T<sub>2</sub> und T<sub>3</sub> zu geringeren Temperaturen. Für Systeme, die sich extrem auf die Mikrostruktur der SC Lipide auswirken, kann prinzipiell ein erhöhter Permeationskoeffizient für Arzneistoffe gezeigt werden. Dies zeigten Winkler und Müller-Goymann [2005] mit Permeationsexperimenten von 5-ALA-butylester aus Poloxamer basierten Zubereitungen, sowie DSC-Messungen an Stratum corneum. Die stärksten Verschiebungen und damit der stärkste Ordnungsverlust, der z.B. mit der Lipidschmelze bei ca. 70 °C (T<sub>2</sub>) einhergeht, konnten auch in der vorliegenden Arbeit direkt mit einer erhöhten Permeabilität für 5-ALA korreliert werden. Dies war bei PoxDI, Thermogel und PoxDIM der Fall, deren Permeationskoeffizienten für 5-ALA durch humanes Stratum corneum am höchsten ausfielen. WAXD-Messungen bestätigten den starken Einfluss von PoxDIM und Thermogel auf Stratum corneum. Sie waren die einzigen Zubereitungen, nach deren Behandlung das SC eine zusätzliche Interferenz aufwies. Eine weitere Einbeziehung der WAXD-Daten in die

Diskussion konnte nicht vorgenommen werden, da hohe Standardabweichungen eine weitergehende Interpretation verhinderten.

DMIS bewirkte im Poloxamer-Basisgel Verschiebungen von  $-3,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für T2 und von  $-4,1\text{ }^{\circ}\text{C}$  für T3 und zeigte somit einen deutlichen Einfluss auf die Mikrostruktur des Stratum corneum. Dieser Einfluss war ähnlich groß wie der von PoxI, und miteinander kombiniert in PoxDI verringerten sich die Phasenübergangstemperaturen nochmals deutlich. Mit Hilfe der WAXD-Messungen lässt sich die Lipid extrahierende Wirkung von IPA in PoxI unterstreichen, da eine entsprechende Interferenz nicht mehr detektiert werden konnte. PoxDI bewirkte die stärksten Temperaturverschiebungen sowohl der Schmelze der lamellaren Lipidschichten, als auch der Protein-assoziierten Lipide vom Gel zum Sol. Die starke Veränderung der Mikrostruktur des SC wirkte sich aber nicht so aus, dass die 5-ALA Permeation in dem Maße wie aus PoxDIM und Thermogel gefördert wurde. Im Gegenteil, dies ist ein Indiz dafür, dass MCT als weitere Komponente unbedingt benötigt wird, um die dichte Packung der Bilayer-Strukturen aufzuweiten und permeabler für den Arzneistoff zu machen, wodurch ein höherer Permeationskoeffizient für 5-ALA wie im Falle von PoxDIM und Thermogel erreicht werden kann. Es ist davon auszugehen, dass neben 5-ALA auch Penetrationsenhancer in das Stratum corneum bzw. in seine interzellulären Räume diffundieren. Von Kapillarkräften angesogen, interagieren sie mit interzellulären Strukturen und schleusen gelöste Arzneistoffmoleküle durch das Stratum corneum [Loth, 1991]. DMIS fungierte als Lösungsvermittler und erhöht die Löslichkeit der hydrophilen 5-ALA in den lipophileren Bereichen zwischen den Hornzellen. Dadurch wurde es dem Arzneistoff erleichtert, in den Interzellularraum zu migrieren. Es reichte also nicht aus, das SC permeabler zu machen, sondern es musste auch die Löslichkeit von 5-ALA in den locker gepackten Regionen verbessert werden, damit eine optimale, schnellere Permeation möglich wurde. Kombiniert mit der Interkalierung des MCT in die Lipidschicht, der quellenden und die Bilayer-Strukturen aufweitenden Eigenschaft des Wassers, sowie der Lipide extrahierenden Wirkung von IPA ergänzte DMIS als Solvens die überragende permeationsfördernde Qualität des Thermogels und von PoxDIM.

Die Verschiebungen von T2 und T3 nach Einwirkung von PoxD, PoxM und PoxI unterschieden sich kaum voneinander. Dies bestätigte insofern die

Permeationsexperimente, als diese keinen signifikanten Unterschied für den Endflux von 5-ALA aus PoxD und PoxI aufzeigten. Die Permeationskurven für PoxM und PoxI verliefen ebenfalls sehr ähnlich, allerdings zeigte PoxM eine sehr viel längere Lag-Zeit für 5-ALA, wodurch der Arzneistoffflux durch das SC später einsetzte und der Permeationskoeffizient etwas größer war. Damit korrelieren die Ergebnisse der DSC-Untersuchungen und der Permeationsexperimente sehr gut.

## 6 Zusammenfassung

Grundlage dieser Arbeit ist die Permeationsförderung von 5-ALA durch humanes Stratum corneum. Die effektive Permeation von 5-ALA durch SC *in vivo* ist Voraussetzung für die vermehrte Bildung von PpIX, dem wirksamen Agens in der Photodynamischen Therapie (PDT). Diverse Forschungsgruppen haben durch Veresterung der 5-ALA ihre Lipophilisierung, und damit ihre erhöhte Permeation durch Membranen, erreicht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit liegt nicht in der Veränderung des Arzneistoffes, sondern in der Optimierung der Formulierung eines halbfesten Systems zur verbesserten Permeation von 5-ALA. In Anlehnung an die Komposition des Fertigarzneimittels Dolgit® Mikrogel ist das arzneistofffreie, angenehm dermal applizierbare Thermogel entwickelt worden. Es setzt sich aus einfachen und leicht zugänglichen Grundstoffen zusammen, die praktisch jede Apotheke dazu befähigen, es problemlos innerhalb weniger Minuten herzustellen. Neben dem Polymer Poloxamer 407 sind Wasser, Isopropylalkohol, der Lösungsvermittler Dimethylisosorbid und mittelkettige Triglyzeride nötig. Die spezielle Eigenschaft der thermoreversiblen Gelierung erlaubt es, Arzneistoffe ohne großen mechanischen Aufwand in der Kälte darin zu lösen.

Mit diesem neu formulierten Vehikel ist es gelungen, für 5-ALA einen um den Faktor 6,37 höheren Permeationskoeffizienten durch das humane Stratum corneum zu erhalten als aus dem Fertigarzneimittel. Ubiquitär eingesetzte Arzneibuchgrundlagen wie Basiscreme DAC (Faktor 7,37) und WHS (Faktor 19,4) bleiben hinter diesen Permeationsergebnissen noch weiter zurück. Permeationsuntersuchungen mit Variationen des Thermogels, die einzelne Komponenten der Endzubereitung kombinieren, zeigen einen überadditiven synergistischen Effekt der Inhaltsstoffe. Es gibt keinen speziellen Penetrationsenhancer; jede Komponente trägt zu der besonderen Qualität der Formulierung bei, keine ist verzichtbar. Damit offenbart sich das überragende permeationsfördernde Potenzial des Thermogels als Gesamtkomposition. Durch das gesteigerte Permeationsvermögen der 5-ALA aus dem neu entwickelten Vehikel besteht in der Praxis die Möglichkeit, die Dosis zu verringern. Dies hilft, unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. Hautirritationen zu vermindern. Als einen weiteren Vorteil bietet das Thermogel eine Erhöhung der Compliance von

Patienten, die photodynamisch therapiert werden sollen. Bekanntermaßen verweilt die 5-ALA-haltige Zubereitung mindestens 3 h auf der Patientenhaut, bevor es zur Lichtaktivierung der dadurch vermehrt gebildeten Protoporphyrine kommt. Diese Applikationsdauer kann verkürzt werden, da das Thermogel den Arzneistoff schneller in tiefere Hautschichten und damit an den Wirkort bringt.

DSC-Messungen belegen eine starke Interaktion des Thermogels mit der Mikrostruktur des Stratum corneum, wodurch letzteres durchlässiger für 5-ALA wird. Dies korreliert eng mit den Ergebnissen der Permeationsuntersuchungen und untermauert diese. Röntgenweitwinkeluntersuchungen zeigen starke Veränderungen der Mikrostruktur der Stratum corneum-Lipide nach Einwirkung des Thermogels oder einer ihm ähnlichen Zubereitung, die alle seine Komponenten enthält. Aufgrund der großen statistischen Schwankungen, können diese Daten aber nur tendenziell gewertet und als Ergänzung zu den DSC-Ergebnissen gesehen werden.

Die Rheologie ermöglicht ein umfangreiches Screening der verschiedenen Zubereitungen und ergibt vor allem umfassende Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften des Thermogels. Unterhalb von 12,7 °C überwiegen die viskosen Eigenschaften des Geles, darüber dominieren seine elastischen Qualitäten, und die Zubereitung geliert. Anhand der Rheologie kann gezeigt werden, dass sich die Präsenz des Arzneistoffes oder anderer Substanzen bzw. Salze immens auf das Fließverhalten des Geles auswirkt. Der Gelierpunkt verschiebt sich bei Anwesenheit von 5-ALA zu geringeren Temperaturen, je größer die Menge an 5-ALA ist. Der pH-Wert hat hingegen keinen Einfluss auf das Fließverhalten. Die Rheogramme von verschiedenen gepufferten Thermogelen sind fast deckungsgleich. Ferner deckt die Rheologie auf, dass das Thermogel seine endgültige Gerüststruktur nicht unmittelbar nach der Herstellung ausgebildet hat, sondern eine gewisse „Reifezeit“ benötigt, was makroskopisch nicht erkennbar ist. Nach einem Tag Lagerung zeigt das Thermogel ein Fließverhalten, bei dem Aufwärts- und Abwärtskurve annähernd deckungsgleich sind. Unmittelbar nach der Herstellung vermessen hingegen, kommt es zu einer Verfestigung des Systems nach Zurücknahme der Scherbeanspruchung. Das Thermogel stellt ein höchst geeignetes Vehikel zur Permeationsförderung von 5-ALA durch humanes Stratum corneum dar, was die PDT erleichtern kann.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aboofazeli, R., Zia, H., Needham, T.E. (2002). "Transdermal delivery of nicardipine: an approach to in vitro permeation enhancement." *Drug Deliv* 9(4): 239-247.
- Ahmadi, S., McCarron, P.A., Donnelly, R.F., Woolfson, A.D., McKenna, K. (2004). "Evaluation of the penetration of 5-aminolevulinic acid through basal cell carcinoma: a pilot study." *Exp Dermatol* 13: 445-451.
- Alexandridis, P., Holzwarth, J.F., Hatton, T.A. (1994). "Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association." *Macromolecules* 27: 2414-2425.
- Angell-Petersen, E., Sorensen, R., Warloe, T., Soler, A.M., Moan, J., Peng, Q., Giercksky, K.-E. (2005). "Porphyrin formation in actinic keratosis and basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate." *J Invest Dermatol* 126: 265-271.
- Auner, B. G., Petzenhauser, E., Valenta, C. (2004). "Influence of 6-ketocholestanol on skin permeation of 5-aminolevulinic acid and evaluation of chemical stability." *J Pharm Sci* 93(11): 2780-2787.
- Babilas, P., Karrer, S., Sidoroff, A., Landthaler, M., Szeimies, R.-M. (2005). "Photodynamic therapy in dermatology - an update." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21: 142-149.
- Babita, K., Kumar, V., Rana, V., Jain, S., Tiwary, A.K. (2006). "Thermotropic and spectroscopic behavior of skin: relationship with percutaneous permeation enhancement." *Curr Drug Deliv* 3: 95-113.
- Bach, M., Lippold, C. (1998). "Percutaneous penetration enhancement and its quantification." *Eur J Pharm Biopharm* 46: 1-13.
- Barrer, R. M. (1939). "Diffusion in and through solids." *Trans Faraday Soc* 35(628).
- Barry, B. W. (1987). "Mode of action of penetration enhancers in human skin." *J Control Release* 6: 85-97.
- Barry, B. W. (1991). "Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement." *J Control Release* 15: 237-248.
- Bauer, K. H., Frömming, K.-H., Führer, C. (1999). "Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie." 6. Auflage.
- Berlex Laboratories. (2002). "Levulan Kerastick." Produktinformation: 1-15.
- Biolitec AG. (2006). "Ad-Hoc-Mitteilung vom 31.5.2006."

- Bisland, S. K., Chien, C., Wilson, B.C., Burch, S. (2006). "Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis." *Photochem Photobiol Sci* 5: 31-38.
- Boehncke, W.-H., Kaufmann, R. (1996). "Photodynamic therapy: At the doorstep of clinical application in widespread dermatoses." *Hautarzt* 47: 825-831.
- Bohorquez, M., Koch, C., Trygstad, T., Pandit, N. (1999). "A study of the temperature-dependent micellization of Pluronic F127." *J Colloid Interface Sci* 216: 34-40.
- Borelli, C., Merk, K., Plewig, G., Degitz, K. (2005). "Licht-/Laser-/PDT-Therapie bei Akne." *Hautarzt* 56(11): 1027-1032.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. (1985). "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption." *Toxicol Lett* 24: 119-124.
- Bouwstra, J., de Vries, M.A., Gooris, G.S., Bras, W., Brussee, J., Ponec, M. (1991). "Thermodynamic and structural aspects of the skin barrier." *J Control Release* 15: 209-220.
- Bouwstra, J., Gooris, G., Ponec, M. (2002). "The lipid organisation of the skin barrier: Liquid and crystalline domains coexist in lamellar phases." *Journal of Biological Physics* 28(2): 221-223.
- Bouwstra, J., Gooris, G.S., Bras, W. (1993). "III. New insights in the lipid structure of the skin barrier." *Dermal and transdermal drug delivery*.
- Bouwstra, J., Gooris, G.S., Dubbelaar, F.E.R., Ponec, M. (2001). "Phase behaviour of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases." *J Lipid Res* 42: 1759-1770.
- Bouwstra, J., Gooris, G.S., Salomons-de Vries, M.A., van der Spek, J.A., Bras, W. (1992). "Structure of human stratum corneum as a function of temperature and hydration: A wide-angle X-ray diffraction study." *Int J Pharm* 84: 205-216.
- Bouwstra, J. A., Gooris, G.S., Bras, W., Downing, D.T. (1995). "Lipid organization in pig stratum corneum." *J Lipid Res* 36: 685-695.
- Brämer, A. (2004). "Direktdampfinjektion - Ein Verfahren zur Herstellung halbfester Zubereitungen." Dissertation.
- Bretschko, E., Szeimies, R.-M., Landthaler, M., Lee, G. (1996). "Topical 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. Evaluation of stratum corneum permeability in vitro." *J Control Release* 42: 203-208.
- Brinkmann, I. (2006). "Einfluss von Hilfsstoffen auf die Permeation von Hydrocortison und Prednicarbat durch exzidiertes humanes Stratum corneum und ein organotypisches Hautkonstrukt." Dissertation.



- Butler, A. R., George, S. (1992). "The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid." *Tetrahedron* 48(37): 7879-7886.
- Cabana, A., Ait-Kadi, A., Juhasz, J. (1997). "Study of the gelation process of polyethylene oxide<sub>a</sub> - polypropylene oxide<sub>b</sub> - polyethylene oxide<sub>a</sub> copolymer (Poloxamer 407) aqueous solutions." *J Colloid Interface Sci* 190: 307-312.
- Casas, A., Fukuda, H., Di Venosa, G., Battle, A.M.DEL.C. (2000). "The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization." *Br J Dermatol* 143: 564-572.
- Charrueau, C., Tuleu, C., Astre, V., Grossiord, J.-L., Chaumeil, J.-C. (2001). "Poloxamer 407 as thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids." *Drug Dev Ind Pharm* 27(4): 351-357.
- Chwilkowska, A., Saczko, J., Modrzycka, T., Marcinkowska, A., Malarska, A., Bielewicz, J., Patalas, D., Banas, T. (2003). "Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells *in vitro*." *Acta Biochim Pol* 50(2): 509-513.
- Colussi, V. C., Feyes, D.K., Mukhtar, H. (1998). "Perspectives of photodynamic therapy for skin diseases." *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 11: 336-346.
- Cornwell, P. A., Barry, B.W., Stoddart, C.P., Bouwstra, J.A. (1994). "Wide-angle X-ray diffraction of human stratum corneum: Effects of hydration and terpene enhancer treatment." *J Pharm Pharmacol* 46: 938-950.
- DAB, Deutsches Arzneibuch (2006).
- DAC, Deutscher Arzneimittel Codex (2006). Govi-Verlag, Eschborn, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart, "Ergänzungsband zum Arzneibuch." Band 1, B-020.
- Daniels, R., Knie, U. (2006). "Galenics of dermal products – vehicles, properties and drug release." *J Dtsch Dermatol Ges* 5: 367-383.
- De Rosa, F. S., Bentley, M.V. a (2000). "Photodynamic therapy of skin cancers: Sensitizers, clinical studies and future directives." *Pharm Research* 17(12): 1447-1455.
- De Rosa, F. S., Lopez, R.F.V., Thomazine, J.A., Tedesco, A.C., Lange, N., Bentley, M.V.L.B. (2004). "*In vitro* metabolism of 5-ALA esters derivatives in hairless mice skin homogenate and *in vivo* PpIX accumulation studies." *Pharm Research* 21: 2247-2252.
- De Rosa, F. S., Marchetti, J.M., Thomazini, J.A., Tedesco, A.C., Bentley, M.V.L.B. b (2000). "A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid *in vitro* cutaneous permeation and *in vivo* protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy." *J Control Release* 65: 359-366.

- Donnelly, R. F., Morrow, D.I.J., McCarron, P.A., Juzenas, P., Woolfson, A.D. (2006). "Pharmaceutical analysis of 5-aminolevulinic acid in solution and in tissues." *J Photochem Photobiol B* 82: 59-71.
- Dougherty, T. J. (1987). "Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumours." *Photochem Photobiol* 45(6): 879-889.
- Edsman, K., Carlfors, J., Petersson, R. (1998). "Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use." *Eur J Pharm Sci* 6: 105-112.
- Elfsson, B., Wallin, I., Eksborg, S., Rudaues, K., Ros, A.M., Ehrsson, H. (1998). "Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution." *J Pharm Sci* 7: 87-91.
- Elias, P. M. (1981). "Epidermal lipids, membranes, and keratinization." *Int J Dermatol* 20(1): 1-19.
- Elias, P. M. (1983). "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation." *J Invest Dermatol* 80(6, supplement): 44-49.
- Elias, P. M. (1990). "The importance of epidermal lipids for the stratum corneum barrier." *Topical drug delivery formulations*: 13-28.
- Fachinformation "Visudyne<sup>R</sup>." (2005). NovartisPharma Juli 2005.
- Fiedler, D. M., Eckl, P.M., Krammer, B. (1996). "Does delta-aminolevulinic acid induce genotoxic effects?" *J Photochem Photobiol B* 33: 39-44.
- Fiedler, H. P. (1996). "Lexikon der Hilfsstoffe." 4. Auflage.
- Flynn, G. L., Yalkowsky, S.H., Roseman, T.J. (1974). "Mass transport phenomena and models: Theoretical concepts." *J Pharm Sci* 63(4): 479-510.
- Foote, C. S. (1968). "Mechanisms of photosensitized oxidation." *Science* 162(3857): 963-970.
- Forslind, B. (1994). "A domain mosaic model of the skin barrier." *Acta Derm Venereol* 74: 1-6.
- Franck, B., Stratmann, H. (1981). "Condensation products of the porphyrin precursor 5-aminolevulinic acid." *Heterocycles* 15(2): 919-923.
- Fritsch, C., Becker-Wegerich, P.M., Schulte, K.-W., Neuse, W., Lehmann, P., Ruzicka, T., Goerz, G. a (1996). "Photodynamische Therapie und Mamillenplastik eines großflächigen Rumpfhautbasalioms der Mamma." *Hautarzt* 47: 438-442.
- Fritsch, C., Verwohlt, B., Bolsen, K., Ruzicka, T., Goerz, G. b (1996). "Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism." *Arch Dermatol Res* 288: 517-521.

- Fritsch, C., Kalka, K., Lehmann, P., Schulte, K.W., Neuse, W., Ruzicka, T., Goerz, G. (1997). "Fluoreszenzdiagnostik mit  $\delta$ -Aminolävulinsäure-induzierten Porphyrinen (Photodynamische Diagnostik) in der Dermatologie." *Zeitschrift für Hautkrankheiten*, H+G 8(72): 570-576.
- Fritsch, C., Homey, B., Stahl, W., Lehmann, P., Ruzicka, T., Sies, H. a (1998). "Preferential relative porphyrin enrichment in solar keratoses upon topical application of  $\delta$ -aminolevulinic acid methylester." *Photochem Photobiol* 68(2): 218-221.
- Fritsch, C., Goerz, G., Ruzicka, T. b (1998). "Photodynamic therapy in dermatology." *Arch Dermatol* 134: 207-214.
- Gadmar, O. B., Moan, J., Scheie, E., Ma, L.-W., Peng, Q. (2002). "The stability of 5-aminolevulinic acid in solution." *J Photochem Photobiol B* 67: 187-193.
- Garson, J. C., Doucet, J., Lévêque, J.-L., Tsoucaris, G. (1991). "Oriented structure in human stratum corneum revealed by X-ray diffraction." *J Invest Dermatol* 96(1): 43-49.
- Gilmore, F. B., McCarron, P.A., Morrow, D.I.J., Murphy, D.J., Woolfson, A.D., Donnelly, R.F. (2006). "In vitro phototoxicity of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester and the influence of barrier properties on their release from a bioadhesive patch." *Eur J Pharm Biopharm* 63: 295-309.
- Gold, M. H., Goldman, M.P., Benedetto, A.V. (2004). "5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy: Where we have been and where we are going." *Dermatol Surg* 30: 1077-1084.
- Golden, G. M., Guzek, D.B., Harris, R.R., McKie, J.E., Potts, R.O. (1986). "Lipid thermotropic transitions in human stratum corneum." *J Invest Dermatol* 86: 255-259.
- Golden, G. M., Guzek, D.B., Kennedy, A.H., McKie, J.E., Potts, R.O. (1987). "Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties." *Biochemistry* 26(8): 2382-2388.
- Gottbrath, S. (2004). "Untersuchungen zur Penetration von Titandioxid Mikropartikeln in humanes Stratum corneum." Dissertation.
- Granick, S., Mauzerall, D. (1958). "Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting  $\delta$ -aminolevulinic acid to coproporphyrinogen." *J Biol Chem* 232: 1119-1140.
- Grossmann, M., Dwyer, P., Wimberley, J. (1995). "PDT for hirsutism (abstract)." *Lasers Surg Med* 7, supplement: 44.
- Hanczko, R., Molnar-Perl, I. (2003). "Derivatization, stability and chromatographic behavior of o-phthaldialdehyde amino acid and amine derivatives: o-phthaldialdehyde/2-mercaptoethanol reagent." *Chromatographia* 57(Supplement): 103-113.

- Henderson, B. W., Dougherty, T.J. (1991). "How does photodynamic therapy work?" *Photochem Photobiol* 55(1): 145-157.
- Higuchi, W. I. (1962). "Analysis of data on the medicament release from ointments." *J Pharm Sci* 51(8): 802-804.
- Ho, J., Guthrie, R. (1987). "Quantitative determination of porphyrins, their precursors and zinc protoporphyrin in whole blood and dried blood by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection." *J Chromatogr* 417(2): 269-276.
- Ho, J., Guthrie, R., Tieckelmann, H. (1986). "Detection of  $\delta$ -aminolevulinic acid, porphobilinogen and porphyrins related to heme biosynthesis by high-performance liquid chromatography." *J Chromatogr* 375: 57-63.
- Hofner, A. F. (2006). "Mit Photosensitizern und Licht heilen." *Pharmazeutische Zeitung* 12.
- Hongcharu, W., Taylor, C.R., Chang, Y., Aghassi, D., Suthamjariya, K., Anderson, R.R. (2000). "Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris." *J Invest Dermatol* 115(2): 183-192.
- Ibbotson, S. H., Jong, C., Lesar, A., Ferguson, J.S., Padgett, M., O'Dwyer, M., Barnetson, R. (2006). "Characteristics of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human skin *in vivo*." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 22: 105-110.
- Iinuma, S., Farshi, S.S., Ortel, B., Hasan, T. (1994). "A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin." *Br J Cancer* 70: 21-28.
- Jori, G. (1990). "Factors controlling the selectivity and efficiency of tumour damage in photodynamic therapy." *Lasers Med Sci* 5: 115-120.
- Junginger, H., Heering, W., Führer, C., Geffers, I. (1981). "Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den kolloidchemischen Aufbau von Salben und Cremes." *Colloid and Polymer Science* 259 (5): 561-567, Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Juzenas, P., Sharfaei, S., Moan, J., Bissonnette, R. (2002). "Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in UV-induced tumours and normal skin of hairless mice after topical application of 5-aminolevulinic acid methyl ester." *J Photochem Photobiol B* 67: 11-17.
- Juzeniene, A., Juzenas, P., Iani, V., Moan, J. (2002). "Topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester, hexylester and octylester derivatives: considerations for dosimetry in mouse skin model." *Photochem Photobiol* 76: 329-334.
- Juzeniene, A., Juzenas, P., Ma, L.-W., Iani, V., Moan, J. (2006). "Topical application of 5-aminolaevulinic acid, methyl 5-aminolaevulinate and hexal 5-aminolaevulinate on normal human skin." *Br J Dermatol* 155: 791-799.

- Kabanov, A. V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y. (2002). "Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery." *J Control Release* 82: 189-212.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994). "Kurzes Lehrbuch der Biochemie." 14. neubearbeitete Auflage.
- Karrer, S., Szeimies, R.-M., Abels, C., Landthaler, M. (1998). "The use of photodynamic therapy for skin cancer." *Onkologie* 21: 20-27.
- Kennedy, J. C., Pottier, R.H. (1992). "Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy." *J Photochem Photobiol B* 14: 275-292.
- Kennedy, J. C., Pottier, R.H., Pross, D.C. (1990). "Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience." *J Photochem Photobiol B* 6: 143-148.
- Kessel, D. (1986). "Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization." *Cancer Letters* 33(2): 183-188.
- Kindl, G., Raab, W. (1993). "Licht und Haut." Govi-Verlag, Eschborn, 3. neubearbeitete Auflage.
- Kligman, A. M., Christophers, E. (1963). "Preparation of isolated sheets of human stratum corneum." *Arch Dermatol* 88: 702-705.
- Kloek, J., Akkermans, W., Beijersbergen van Henegouwen, G.M.J. (1998). "Derivatives of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy: enzymatic conversion into protoporphyrin." *Photochem Photobiol* 67(1): 150-154.
- Kloek, J., Beijersbergen van Henegouwen, G.M.J. (1996). "Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy." *Photochem Photobiol* 64(6): 994-1000.
- Kuhs GmbH (2007). "Produktinformationen DMS® und Probiol®." Internetseite Firma Kuhs; [www.kuhs.com](http://www.kuhs.com)
- Laboratorium Galderma GmbH (2002). "Wissenschaftliche Basisinformation Metvix®". 1. Auflage Juli 2002, Nachdruck Januar 2003.
- Landmann, L. (1991). "Die Permeabilitätsbarriere unserer Haut." *Pharmazie in unserer Zeit* 4 (20. Jahrgang).
- Leopold, C. S., Lippold, B.C. (1995). "An attempt to clarify the mechanism of the penetration effects of lipophilic vehicles with differential scanning calorimetry (DSC)." *J Pharm Pharmacol* 47: 276-281.
- Lieb, S., Szeimies, R.-M., Lee, G. (2002). "Self-adhesive thin films for topical delivery of 5-aminolevulinic acid." *Eur J Pharm Biopharm* 53: 99-106.

- Lopez, R. F. V., Bentley, M.V.L.B., Delgado-Charro, M.B., Guy, R.H. (2003). "Optimization of aminolevulinic acid delivery by iontophoresis." *J Control Release* 88: 65-70.
- Lopez, R. F. V., Lange, N., Guy, R., Bentley, M.V.L.B. (2004). "Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters." *Adv Drug Deliv Rev* 56: 77-94.
- Loth, H. (1979). "In vitro-Modelle für die Arzneistoffliberation aus Salben." Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York
- Loth, H. (1986). "Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen, I." *Acta Pharm Technol* 32(3): 109-114.
- Loth, H. (1987). "Grundlagen des intra- und transdermalen Transports von Arzneistoffen, II." *Acta Pharm Technol* 33 (1): 3-14.
- Loth, H. (1991). "Vehicular influence on transdermal drug penetration." *Int J Pharm* 68: 1-10.
- Malik, Z., Kostenich, G., Roitman, L., Ehrenberg, B., Orenstein, A. (1995). "Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice." *J Photochem Photobiol B* 28: 213-218.
- McCarron, P. A., Donnelly, R.F., Andrews, G.P., Woolfson, A.D. (2005). "Stability of 5-aminolevulinic acid in novel non-aqueous gel and patch-type systems intended for topical application." *J Pharm Sci* 94(8): 1756-1771.
- McCarron, P. A., Donnelly, R.F., Zawislak, A., Woolfson, A.D. (2006). "Design and evaluation of a water-soluble bioadhesive patch formulation for cutaneous delivery of 5-aminolevulinic acid to superficial neoplastic lesions." *Eur J Pharm Sci* 27: 268-279.
- Merclin, N., Sparr, E., Guy, R.H., Ehrsson, H., Engström, S. b (2004). "Transdermal delivery from a lipid sponge phase - iontophoretic and passive transport in vitro of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester." *J Control Release* 100: 191-198.
- Merclin, N., Bramer, T., Edsman, K. a (2004). "Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using carbopol gel as vehicle." *J Control Release* 98: 57-65.
- Metvix "Wissenschaftliche Basisinformation". (2002). 1. Auflage Juli 2002 (Nachdruck Januar 2003).
- Mezger, T. (2000). "Das Rheologie-Handbuch." Vincentz-Verlag Hannover.
- Miller, S. C., Drabik, B.R. (1984). "Rheological properties of poloxamer vehicles." *Int J Pharm* 18(33): 269-276.

- Morton, C. A., Brown, S.B., Collins, S., Ibbotson, S., Jenkinson, H., Kurwa, H., Langmack, K., McKenna, K., Moseley, H., Pearse, A.D., Stringer, M., Taylor, D.K., Wong, G., Rhodes, L.E. (2002). "Guidelines for topical therapy: report of a workshop of the British Photodermatology Group." *Br J Dermatol* 146: 552-567.
- Müller-Goymann, C. C. (2004). "Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration." *Eur J Pharm Biopharm* 58: 343-356.
- Müller-Velten, R., Michels, S., Schmidt-Erfurth, U., Laqua, H. (2003). "Photodynamische Therapie: erweiterte Indikationen." *Ophthalmologe*(100): 384-390.
- Neuberger, Vorstand der Biolitec AG. (2006). "Aktien-Check, Analysen-Nebenwerte, Biolitec Vorstandsinterview."
- Neubert, R., Schmalfuß, U., Wohlrab, W., Huschka, C. (1996). "Wirkstoffpenetration in die Haut und deren Modulation." *Pharmazeutische Zeitung* 17(141. Jahrgang): 1483-1493.
- Novo, M., Hüttman, G., Diddens, H. (1996). "Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours." *J Photochem Photobiol B* 34: 143-148.
- Odland, G. F. (1960). "A submicroscopic granular component in human epidermis." *J Invest Dermatol* 34: 11-15.
- Oleinick, N. L., Evans, H.H. (1998). "The Photobiology and Photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms." *Radiat Res* 150 (suppl.): 146-156.
- Pandey, R. K., Goswami, L.N., Chen, Y., Gryshuk, A., Missert, J.R., Oseroff, A., Dougherty, T.J. (2006). "Nature: A rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy." *Lasers in Surgery and Medicine* 38: 445-467.
- Peng, Q., Moan, J., Warloe, T., Iani, V., Steen, H.B., Bjorseth, A., Nesland, J.M. (1996). "Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin." *J Photochem Photobiol B* 34: 95-96.
- Peng, Q., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Nesland, J.M. a (1997). "5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy: Principles and Experimental Research." *Photochem Photobiol* 65(2): 235-251.
- Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K.-E., Nesland, J.M. b (1997). "5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges." *Cancer Letters* 79(12): 2282-2308.

- Peng, Q., Soler, A.M., Warloe, T., Nesland, A.M., Giercksky, K.-E. (2001). "Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate." *J Photochem Photobiol B* 62: 140-145.
- Pharmacopoeia Europaea (2005). 5. Ausgabe.
- Pharmacopoea Helvetica (1997). Deutsche Ausgabe 8.
- Physica® Messtechnik GmbH (1991). "Ein kleiner Rheologiekurs, Teil 2: Oszillation."
- Pierre, M. B. R., Tedesco, A.C., Marchetti, J.M., Bentley, M.V.L.B. (2001). "Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study." *BMC Dermatol* 1(5).
- Pierre, M. B. R., Ricci Jr, E., Tedesco, A.C., Bentley, M.V.L.B. (2006). "Oleic acid as optimizer of the skin delivery of 5-aminolevulinic acid in Photodynamic Therapy." *Pharm Research* 23(2): 360-366.
- Pilgram, G. S. K., Engelsma-van Pelt, A.M., Bouwstra, J.A., Koerten, H.K. (1999). "Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature." *J Invest Dermatol* 113: 403-409.
- Poljacki, M., Jovanovic, M., Matovic, L., Lugonja, B., Gajic, B., Ros, T. (2006). "Topical photodynamic therapy." *Archive of oncology* 14(1-2): 39-44.
- Pollock, B., Turner, D., Stringer, M.R., Bojar, R.A., Goulden, V., Stables, G.I., Cunliffe, W.J. (2004). "Topical aminolaevulinic acid-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris: a study of clinical efficacy and mechanism of action." *B J Dermatol* 151: 616-622.
- Polo, L., Valduga, G., Jori, G., Reddi, E. (2002). "Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts." *Int J Biochem Cell Biol* 34(1): 10-23.
- Raab, W., Kindl, U. (1999). "Pflegekosmetik." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 3. Auflage.
- Ricci, E. J., Bentley, M.V.L.B., Farah, M., Bretas, R.E.S., Marchetti, J.M. (2002). "Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels." *Eur J Pharm Sci* 17: 161-167.
- Rose, C. (1999). "Stabilitätsbeurteilung von O/W-Cremes auf Basis der Wasserhaltigen Hydrophilen Salbe DAB 1996." Dissertation.
- Rose, C., Daniels, R. (1999). "Grundlagen der Rheologie- Anwendungsbeispiele zur Stabilitätsprüfung von Dermatika." *PZ Prisma* 6. Jahrgang(2): 129-139.
- Rote Liste (2006).



- Roth, H. J. (2003). "Photodynamische Therapie." *Deutsche Apotheker Zeitung* 27: 48-54.
- Roth, M. (1971). "Fluorescence reaction for amino acids." *Anal Chem* 43(7): 880-882.
- Schmook, F. P., Meingassner, J.G., Billich, A. (2001). "Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in-vitro percutaneous absorption." *Int J Pharm* 215: 51-56.
- Schurer, N. Y., Elias, P.M. (1991). "The biochemistry and function of stratum corneum lipids." *Adv Lipid Res* 24: 27-56.
- Silva, C. L., Nunes, S.C.C., Eusebio, M.E.S., Pais, A.A.C.C., Sousa, J.J.S. a (2006). "Thermal behaviour of human stratum corneum." *Skin Pharmacol Physiol* 19: 132-139.
- Silva, C. L., Nunes, S.C.C., Eusebio, M.E.S., Sousa, J.J.S., Pais, A.A.C.C. b (2006). "Study of human stratum corneum and extracted lipids by thermomicroscopy and DSC." *Chem Phys Lipids* 140: 36-47.
- Sinha, V. R., Kaur, M.P. (2000). "Permeation enhancers for transdermal drug delivery." *Drug Dev Ind Pharm* 26(11): 1131-1140.
- Small et al., D. M. (1988). "The physical chemistry of lipids: from alkanes to phospholipids." *Handbook of lipid research* 4 (2. Auflage).
- Stryer, L. (1990). "Biochemie." 4. Auflage.
- Swartzendruber, D. C., Wertz, P.W., Madison, K.C., Downing, D.T. (1987). "Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope." *J Invest Dermatol* 88: 709-713.
- Sweeney, T. M., Downing, D.T. (1970). "The role of lipids in the epidermal barrier to water diffusion." *J Invest Dermatol* 55(2): 135-140.
- Szeimies, R.-M., P. Calzavara-Pinton, S. Karrer, B. Ortel, M. Landthaler (1996). "Topical photodynamic therapy in dermatology." *J Photochem Photobiol B* 36: 213-219.
- Tang, H., Mayersohn, M. (2006). "A global examination of allometric scaling for predicting human drug clearance and the prediction of large vertical allometry." *J Pharm Sci* 95(8): 1783-1799.
- Turchiello, R. F., Vena, F.C.B., Maillard, P., Souza, C.S., Bentley, M.V.B.L., Tedesco, A.C. (2003). "Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT)." *J Photochem Photobiol B* 70(1): 1-6.
- Uebelhover, N. S., Dover, J.S. (2005). "Photodynamic therapy for cosmetic applications." *Dermatol Ther* 18: 242-252.

- Uehlinger, P., Zellwegger, M., Wagnières, G., Juillerat-Jeanneret, L., van den Bergh, H., Lange, N. (2000). "5-aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells." *J Photochem Photobiol B* 54: 72-80.
- Valenta, C., Auner, B.G., Lobl, I. (2005). "Skin permeation and stability studies of 5-aminolevulinic acid in a new gel and patch formulation." *J Control Release* 107(3): 495-501.
- van den Akker, J.T.H.M., Iani, V., Star, W.M., Sterenborg, H.J.C.M., Moan, J. (2000). "Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum." *Photochem Photobiol* 72(5): 681-689.
- van Duzee, B. F. (1975). "Thermal analysis of human stratum corneum." *J Control Release* 65(4): 404-408.
- Waksman, R., Leitch, I.M., Roessler, J., Yazdi, H., Seabron, R., Tio, F., Scott, R.W., Grove, R.I., Rychnovsky, S., Robinson, B., Pakala, R., Cheneau, E. (2006). "Intracoronary photodynamic therapy reduces neointimal growth without suppressing re-endothelialisation in a porcine model." *Heart* 92(8).
- Webber, J., Herman, M., Kessel, D., Fromm, D. (2000). "Photodynamic treatment of neoplastic lesions of the gastrointestinal tract." *Arch Surg* 385(4): 299-304.
- Wertz, P. W., Downing, D.T., a (1989). "Stratum corneum: Biological and biochemical considerations." *Transdermal drug delivery*: 1-22.
- Wertz, P. W., Madison, K.C., Downing, D.T., b (1989). "Covalently bound lipids of human stratum corneum." *J Invest Dermatol* 92(1): 109-111.
- Williams, M. L., Elias, P.M. (1987). "The extracellular matrix of stratum corneum: role of lipids in normal and pathological function." *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 3(2): 95-122.
- Winkler, A. (2005). "Untersuchungen zur Permeation von 5-Aminolävulinsäure (ALA) und ALA-*n*-butylester durch exzidiertes humanes Stratum corneum und organotypisches Hautkonstrukt." Dissertation.
- Winkler, A., Müller-Goymann, C.C (2002). "Comparative permeation studies for  $\delta$ -aminolevulinic acid and its butyl-ester through stratum corneum and artificial skin constructs." *Eur J Pharm Biopharm* 53: 281-287.
- Winkler, A., Müller-Goymann, C.C. (2005). "The influence of topical formulations on the permeation of 5-aminolevulinic acid and its *n*-butyl ester through excised human stratum corneum." *Eur J Pharm Biopharm* 60(3): 427-438.
- Wood, S., Metcalf, D., Devine, D., Robinson, C. (2006). "Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms." *J Antimicrob Chemother* 57: 680-684.

---

Ziegenmeyer, J. (1989). "Transdermale Applikation von Arzneistoffen."  
Pharmazeutische Zeitung 18 (134. Jahrgang): 1085-1091.